



**Universidade de
Aveiro
2010**

Departamento de Biologia

**Ana Maria Ferreira
Capitão**

**Observação de efeito do campo magnético em três
espécies de clorófitas**



**Universidade de
Aveiro
2010**

Departamento de Biologia

**Ana Maria Ferreira
Capitão**

**Observação de efeito do campo magnético em três
espécies de clorófitas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Dr. Sushil Kumar Mendiratta, Professor catedrático do Departamento de Física da Universidade de Aveiro e co-orientação do Dr. António Calado, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Dra. Maria Adelaide De Pinho Almeida

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Sushil Kumar Mendiratta

Professor catedrático do Departamento de Física da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. António José Brito Mendes Calado

Professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Dra. Lília Maria Antunes dos Santos

Professora auxiliar do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra

agradecimentos

Em primeiro gostaria de agradecer aos meus orientadores, Dr. Sushil Kumar Mendiratta e Dr. António Calado da Universidade de Aveiro pelo apoio e orientação durante a realização deste trabalho.

Agradeço a todo o laboratório de sólidos não cristalinos do departamento de física da Universidade de Aveiro, especialmente ao Engenheiro Jorge Monteiro, pela forma como me receberam e ajudaram durante todo o meu trabalho.

Agradeço também à algoteca de Coimbra pelas culturas facultadas, à Dra. Sandra Calado e à doutoranda Ana Luís pelos meios de cultura, culturas e principalmente pelo tempo dispendido.

Agradeço ainda à Professora Susana Mendes da Escola Superior de Turismo e Tecnologia de Mar pela ajuda na análise estatística.

Não posso esquecer a minha família e amigos que sempre me apoiaram, e estiveram comigo apesar da distância.

E por ultimo, não poderia deixar de agradecer ao meu Nico por todo o apoio, paciência e amor.

palavras-chave

Campo magnético, electroíman arrefecido, alterações celulares, algas, taxa de crescimento, *Spirogyra sp.*, *Pediastrum duplex*, *Pandorina morum*.

resumo

Os campos magnéticos são uma presença constante no dia a dia. A sua interacção com os organismos biológicos tem ganho cada vez mais relevância à medida que vão aparecendo mais estudos, estes possuem diferentes resultados e propõem diferentes mecanismos, torna-se portanto essencial perceber quais os resultados unicamente devido ao efeito do campo magnético e quais são devido outros factores. Com esse propósito desenvolveu-se um procedimento para avaliar os efeitos dos campos magnéticos no crescimento de diferentes tipos de algas, *Spirogyra sp.*, *Pediastrum duplex*, *Pandorina morum* excluindo assim outros factores. *Spirogyra sp.* revelou um crescimento mais lento quanto maior a intensidade do campo magnético aplicada, sem alterações significativas devido à temperatura. *Pediastrum duplex* e *Pandorina morum* demonstraram alterações de crescimento devido a pequenas alterações da temperatura, estas camuflaram possíveis efeitos de campos magnéticos. Os resultados obtidos apoiam a ideia de que o mecanismo de interacção entre os campos magnéticos e os organismos biológicos não é tão simples como por exemplo o efeito de choque térmico. Continuam a ser efectuadas experiências para comprovar que os resultados obtidos não são devidos outros factores, e serão testados vários mecanismos susceptíveis a interacções com o campo magnético, como é o caso da fotossíntese.

keywords

Magnetic field, cooled electromagnet, cellular changes, algae, growth rate, *Spirogyra sp.*, *Pediastrum duplex*, *Pandorina morum*.

abstract

Magnetic fields are a constant presence in everyday life. Their interaction with biological organisms is acquiring more relevance as more studies appear. Many studies have different results and propose a diversity of mechanisms to explain sometime contradictory results. It is, therefore, essential to separate the results due the effect of the magnetic field from what may be due to other factors. We have developed a methodology to evaluate the effect of magnetic field on the growth of different types of algae; *Spirogyra sp.*, *Pediastrum duplex* and *Pandorina morum*, and minimising the effect of other stress factors. *Spirogyra sp.* showed a slower growth as the intensity of the applied magnetic field was increased and no significant changes due to temperature. *Pediastrum duplex* and *Pandorina morum*, however, showed alterations in growth due to small temperature changes, thus possibly masking the effects of magnetic fields. The results support the idea that the mechanism of interaction between magnetic fields and biological organisms is not as simple as for example of a thermal shock. Experiments are continuing to improve the discrimination of the effects due to field. Also, several mechanisms, like photosynthesis, will be tested that may be involved in the interaction of the magnetic field in these species.

Índice

1. Introdução

1.1.Campos magnéticos	1
1.2.Interacção dos campos magnéticos com os organismos biológicos	3
1.3.Magnetorecepção e Magnetotaxia	5
1.3.1.Bacterias	6
1.3.2.Algas	7
1.4.Alterações ao nível celular atribuídas à exposição a campos magnéticos	
1.4.1.Cálcio	8
1.4.2.Expressão genética	10
1.4.3.Morfologia Celular	12
1.4.4.Viabilidade e Crescimento Celular	13
1.4.5.Fotossíntese	13
1.4.6.Estudos com algas e cianobactérias	14
1.5.Controvérsia dos resultados	15
1.6. Âmbito e motivação da investigação	16

2. Material e métodos

2.1.Material biológico	17
2.1.1. <i>Spirogyra sp.</i>	17
2.1.2. <i>Pandorina morum</i>	18
2.1.3. <i>Pediastrum duplex</i>	18
2.2.Condições de cultura	19
2.3.Descrição do dispositivo experimental	19
2.4.Procedimento experimental	21
2.4.1. <i>Spirogyra sp.</i>	21
2.4.2. <i>Pediastrum duplex</i> e <i>Pandorina morum</i>	22
3.5.Técnicas de análise de dados	23

3.Resultados e discussão

3.1 Características do electroíman	24
3.2 Testes Preliminares de <i>Spirogyra sp.</i>	26
3.3 Efeito do campo magnético sobre a mitose em <i>Spirogyra sp.</i>	28
3.4 Testes Preliminares de <i>Pandorina morum</i>	30
3.5 Efeito do campo magnético no crescimento de <i>Pandorina morum</i>	33
3.6 Testes Preliminares de <i>Pediastrum duplex</i>	38
3.7 Efeito do campo magnético no crescimento de <i>Pediastrum duplex</i>	40
3.8 Alterações morfológicas devido à exposição ao campo magnético	44

5. Conclusão e perspectivas futuras	45
-------------------------------------	----

6. Bibliografia	48
-----------------	----

1. Introdução

1.1. Campos magnéticos

O campo magnético (B) é a região do espaço na qual actuam forças magnéticas (Burns e Macdonald, 1975), que não se vê, não se sente e não é atenuado pela maioria dos materiais, incluindo os constituintes biológicos, como a membrana celular (Bioinitiative Report, 2007). O mesmo é mais intenso junto da fonte e diminui com a distância. A sua unidade no sistema internacional é o tesla (T). Os campos magnéticos podem ser uniformes quando mantêm a mesma intensidade de campo num determinado local, e contínuos, quando mantêm uma determinada intensidade de campo magnético ao longo do tempo, ou alternados, quando a intensidade varia (Burns e Macdonald, 1975).

A interacção entre os campos magnéticos e objectos de diferentes materiais pode ser classificada de três formas diferentes (Gerthsen et al., 1998):

- Diamagnetismo, quando o objecto é repellido pelo campo magnético;
- Paramagnetismo, quando o objecto é atraído pelo campo magnético;
- Ferromagnetismo, quando após a exposição ao campo magnético o objecto mantém um campo magnético. Esses materiais são utilizados para produzir ímanes permanentes (ex: materiais ricos em: ferro, níquel, cobalto)

Os campos magnéticos podem ser produzidos de duas formas: através de ímanes ou de correntes eléctricas (Giancoli, 1998).

Qualquer íman, independentemente da sua forma, tem dois terminais ou faces, chamados pólos, que são os locais em que o campo magnético é mais forte. O pólo de um íman livremente suspenso que apontar para norte é designado o pólo norte do íman, o outro pólo que aponta para sul é designado o pólo sul (Giancoli, 1998).

Os ímanes podem ser permanentes, quando após terem sido magnetizados mantêm um campo magnético, ou electroímanes, quando o seu campo magnético depende da passagem de corrente eléctrica. Os electroímanes são constituídos por um solenóide (bobina de fio composta por várias espiras) com um pedaço de ferro “macio” (ferro que adquire e perde o seu magnetismo rapidamente) no seu interior. Este tipo de íman consegue produzir um campo magnético consideravelmente elevado. Devido à sua corrente

contínua os electroímans produzem calor, sendo por isso necessário a construção de bobinas arrefecidas que neutralizem este efeito (Giancoli, 1998).

Os campos magnéticos podem ser de origem natural, como o campo magnético terrestre, ou artificial, como os produzidos pela vasta gama de tecnologias que alteraram o panorama da nossa vida (Quadro 1) (Bioinitiative Report, 2007). Na tentativa de explicar os efeitos biológicos dos campos magnéticos, é útil classificá-los como fracos (< 1mT(miliTesla)), moderados (1mT – 1T), fortes (1T – 5T) e ultra-fortes (>5T) (Dini e Abbro, 2005).

Quadro 1 – Exemplos de campos magnéticos naturais e artificiais existentes e respectivas intensidades (adaptado de Dini e Abbro, 2005)

Campos	Intensidade	Fonte	Referência
Fracos (<1mT)	0.1-0.3 μ T (microTesla)	Residências	NRC, 1996
	30 μ T	Linhas de transmissão	Simon et al., 1992
	30-70 μ T	Geomagnético	Polk e Postow, 1996
	50-150 μ T	Electrodomésticos	Simon et al., 1992
	40-270 μ T	Estações geradoras	
Moderado (1mT-1T)	50 mT	Reactores de fusão; comboios Maglev	Polk e Postow, 1996
	>50 mT	Equipamento DC (ex. processos electrolíticos, caminhos de ferro, reactores de fusão, etc.);	
Forte (1T-5T)	1.5-2.5 T	Ressonância magnética	NRC, 1996
Ultra-fortes (>5T)	10 T	Aplicações médicas futuras	Simon et al., 1992

1.2. Interacção dos campos magnéticos com os organismos biológicos

A maioria das tecnologias eléctricas foi desenhada para maximizar a eficiência energética, sem ter em consideração os efeitos biológicos. O rápido aumento de distribuição das mesmas levanta preocupações relacionadas com os possíveis riscos ou desordens funcionais nos sistemas biológicos (Bioinitiative Report, 2007). Os avanços nas últimas décadas elevaram o estatuto da pesquisa biomagnética ao nível de novo campo de investigação emergente. As observações experimentais de efeitos biomagnéticos não podem continuar a ser interpretadas como artefactos, mesmo que os mecanismos moleculares e celulares ainda não sejam claros. O conhecimento actual sobre os efeitos dos campos magnéticos em organismos vivos ainda é diminuto, sendo necessária mais pesquisa (Dini e Abbro, 2005).

Os campos magnéticos são praticamente imperturbáveis pelos tecidos biológicos, dessa forma interagem directamente com as moléculas anisotrópicas (polarizadas) ou com materiais ferromagnéticos e cargas em movimento (correntes) (Repacholi et al., 1999). Existem quatro mecanismos pelos quais os campos magnéticos podem interagir com os tecidos vivos (Repacholi e Greenbaurn., 1999):

1. Indução magnética – os campos magnéticos exercem forças que movem iões em solução (ex: electrólitos), dando origem a campos eléctricos e correntes;
2. Efeito magnético-mecânico – os campos magnéticos produzem torções em determinadas moléculas e em qualquer material ferromagnético, tal como a magnetite;
3. Interações electrónicas – os campos magnéticos conseguem alterar níveis de energia e a orientação da rotação dos electrões.
4. Magnetorecepção – os organismos utilizam sensores para se orientarem no campo geomagnético (Kirschvink et al., 2010).

Existe um elevado número de tentativas para explicar os efeitos biológicos da exposição ao campo magnético nos organismos eucariotas e procariotas a nível molecular (El May et al., 2009). Já foi demonstrado que o campo magnético pode afectar funções biológicas dos organismos através de alterações no crescimento, proliferação e viabilidade celular (Raylman et al., 1996; Potenza et al., 2004b), na morfologia celular, na indução de mutações pontuais do ADN (ácido desoxirribonucleico) (Potenza et al., 2004a), e provocando alterações na quantidade de cálcio (Amara et al., 2004) (quadro resumo no anexo I). Foi também demonstrado que alguns organismos possuem a capacidade de detectar o campo geomagnético e orientarem o seu movimento em função do mesmo, esta orientação pode ser activa ou passiva, magnetorecepção ou magnetotaxia (Komeili, 2007)

1.3.Magnetorecepção e Magnetotaxia

A ideia de os animais conseguirem detectar o campo magnético da terra passou de ser considerada ridícula a ser um facto bem estabelecido em pouco mais de uma geração (Komeili et al., 2007). Dezenas de experiências demonstram actualmente que diversas espécies de animais possuem uma “bússola” interna, exemplo disso é o atum (Walker et al., 2002), as abelhas (Walker et al., 2002; Kirschvink et al., 2010), os pombos correio (Mora et al., 2002), as trutas (Walker et al., 2002), o peixe zebra, a tilápia (Shcherbakov et al., 2005), os tubarões e as raias (Kirschvink et al., 2010; Meýer et al., 2005). A forma como os animais sentem o campo magnético permanece um tópico controverso (Kirschvink et al., 2010).

A subsequente identificação de no mínimo dois mecanismos biofísicos plausíveis para a magnetorecepção pelos animais, um baseado na magnetite biogénica e outro nas reacções bioquímicas, levaram a maiores esforços nas ultimas décadas para testar estes dois modelos, assim como para perceber a ultraestrutura e função das possíveis células magnetoreceptoras. Infelizmente, os progressos para entender a magnetorecepção têm tido como desafios (Kirschvink et al., 2010):

- (i) A disponibilidade poucas técnicas para analisar as respostas comportamentais dos animais aos campos magnéticos;
- (ii) A dificuldade em conseguir resultados reprodutíveis utilizando as técnicas disponíveis;
- (iii) A dificuldade em desenvolver e implementar novas técnicas que tragam mais poder experimental.

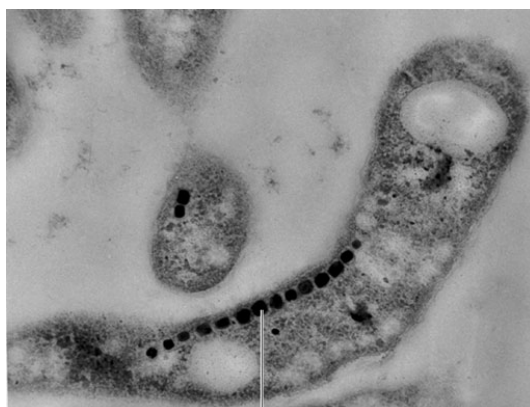
O único magnetoreceptor conclusivamente demonstrado foi encontrado no fitoplankton e bactérias, estes contêm cadeias de cristais de minerais ferromagnéticos, magnetite (Fe_3O_4) ou greigite (Fe_3S_4) (Kirschvink et al., 2010).

A biomineralização de magnetite é um fenómeno bem conhecido, tendo sido inicialmente descoberta em moluscos por Lowenstam (1962). Análises bioquímicas subsquentes mostraram que a magnetite biogénica é um mecanismo viável para a magnetorecepção (Kirschvink et al., 2010; Yorke, 1979). Os cristais de magnetite perfeitamente adequados à magnetorecepção foram encontrados em todos os domínios de

organismo excepto Archaea, com uma variedade de candidatos a receptores nos tecidos animais (Kirschvink et al., 2010).

1.3.1. Bactérias

As bactérias magnetotáticas são um grupo de organismos filogeneticamente e morfológicamente diverso que consegue alinhar o seu sistema de navegação de acordo com o campo geomagnético. Esta característica única é conseguida com a ajuda dos magnetossomas (figura 1), cristais magnéticos rodeados por uma membrana e organizados em cadeias dentro da célula (Komeili, 2007).



Magnetossoma

Figura 1 – Bactéria magnetotática. Microfotografia através de microscopia electrónica de transmissão de *Magnetospirillum magneticum*. Pode-se observar uma cadeia de partículas magnéticas (magnetossomas) (Komeili, 2007).

Ao examinar uma bactéria magnetotática, recorrendo à microscopia electrónica de transmissão, consegue-se observar a base física da magnetotaxia. Cada Bactéria magnetotática está equipada com uma ou mais cadeias de organelos especializados. Estes organelos consistem em cristais com 30-50 nm de magnetite de óxido de ferro, ou greigite de sulfeto de ferro, rodeados por uma membrana com uma bicamada lipídica (Komeili, 2007). Esta cadeia está fixa dentro da célula permitindo que a bactéria se alinhe passivamente com os campos magnéticos externos. Nos 30 anos seguintes à sua descoberta por Blackmore (Blackmore, 1975), as bactérias magnetotáticas e os magnetossomas têm sido o centro de uma variedade de esforços interdisciplinares com o objectivo de caracterizar e explorar as propriedades magnéticas destes cristais (Komeili, 2007).

Já se observaram desde organismos com apenas um ou dois cristais de magnetite, até organismos com centenas de partículas magnéticas (Komeili, 2007). Existe uma

variação considerável na forma dos cristais produzidos, as suas morfologias variam entre formas redondas a formas de bala (Thornhill et al., 1994). Na maioria dos casos, contudo, os cristais magnéticos são quimicamente puros. Já foram identificadas estruturas semelhantes a magnetossomas e minerais magnéticos também em organismos eucarióticos (Kirschvink et al., 2010).

1.3.2. Algas

Um exemplo de algas magnetotáticas encontra-se no gênero *Anisonema*, estas contêm várias cadeias de magnetite que parecem estar localizadas perto da parede celular. Cada cadeia é um dipolo magnético permanente (Frankel, 1984). Araújo et al. (1986) observaram que as células de *Anisonema sp.* quando mortas e suspensas em água mantinham a direcção do campo magnético e quando este era trocado as células davam uma volta de 180°.

1.4. Alterações ao nível celular atribuídas à exposição a campos magnéticos

1.4.1. Cálcio

O fluxo de iões é considerado por vários autores um dos principais alvos das radiações magnéticas em diversos modelos experimentais (Rosen e Rosen, 1990; Fanelli et al., 1999; Teodori et al., 2002a; Chionna et al., 2003). A acção dos campos magnéticos nos sistemas biológicos poderá estar ligada a propriedades da estrutura molecular da membrana como a anisotropia magnética (Dini e Abbro, 2005) ou propriedades diamagnéticas (ex: rotação das moléculas de fosfolípidos da membrana) (Rosen, 2003). O efeito dos campos magnéticos na estrutura molecular das membranas excitáveis pode ser o suficiente para modificar a função dos canais iónicos. (Rosen, 2003).

Durante mais de uma década de pesquisa sobre os efeitos dos campos magnéticos nos sistemas biológicos tem-se conseguido compilar dados que demonstram o envolvimento das vias de sinalização de Ca^{2+} (ião cálcio) como alvo primário dos mesmos. Esta é uma das principais vias de sinalização intracelular, o que torna esta descoberta de elevada relevância fisiológica (Dini e Abbro, 2005). As propostas de efeitos fisiológicos das alterações de Ca^{2+} devido à exposição a campos magnéticos variam de autor para autor. Já foram demonstradas alterações na função ciliar (Rosen e Rosen, 1990), alterações na taxa de proliferação celular (Dini e Abbro, 2005), alterações na frequência de apoptose (Fanelli et al., 1999; Teodori et al., 2002a,b; Chionna et al., 2003; Bian et al., 1997; Buemi et al., 2001; Tenuzzo et al., 2009) e alterações morfológicas (Popov et al., 1991; Santoro et al., 1997).

Com a aplicação de campos magnéticos foi observado um aumento na sobrevivência das células por inibição da apoptose através da modulação da entrada Ca^{2+} na célula (Fanelli et al., 1999; Teodori et al., 2002a,b; Chionna et al., 2003). Os fluxos de Ca^{2+} são cruciais como mediadores na sinalização para o desenvolvimento da apoptose. Um aumento na quantidade de Ca^{2+} , devido à libertação do Ca^{2+} intracelular e à entrada de Ca^{2+} do meio extracelular, é um fenómeno geral na apoptose (Bian et al., 1997). Em muitos tipos celulares foram medidas elevadas concentrações de Ca^{2+} após a exposição simultânea a campos magnéticos e drogas apoptogénicas. Contudo, o papel do aumento de Ca^{2+} durante a apoptose é ambíguo pois tem efeitos diferentes em sistemas celulares diferentes (Fanelli et al., 1999). Assim, um aumento no Ca^{2+} acompanha a apoptose quer possua um papel anti-apoptótico ou pró-apoptótico (Teodori et al., 2002a,b). A escolha do

sistema celular pode explicar os diversos resultados relatados por outros investigadores que em contraste falharam na detecção de efeitos apoptóticos dos campos magnéticos (Teodori et al., 2002a,b; Buemi et al., 2001).

O aumento e a mobilização de Ca^{2+} no interior das células devido à exposição aos campos magnéticos pode também ser responsável por alterações morfológicas como microvilosidades lamelares. Alguns dos estudos disponíveis sugerem que o mecanismo de reorganização e quebra de diferentes elementos do citoesqueleto poderá estar relacionado com a modificação da homeostasia do Ca^{2+} , ou com a alteração do estado fosforilado vs desfosforilado das proteínas (Popov et al., 1991; Santoro et al., 1997). O aumento e a mobilização de Ca^{2+} durante a exposição aos campos magnéticos pode causar, directa ou indirectamente, a reorganização de microfilamentos, de microtúbulos e alterações no formato celular (Dini e Abbro, 2005).

Apesar da interacção dos campos magnéticos com a membrana celular, a transferência de energia para o Ca^{2+} , pode ser explicada a nível físico através de diversos modelos, a incerteza encontra-se no local da interacção bioquímica dos campos magnéticos. Contudo, através do conhecimento actual de dados experimentais e teorias, podem ser definidas três propriedades essenciais da interacção bioquímica (Dini e Abbro, 2005):

- (i) O sistema de interacção deve conter uma molécula de Ca^{2+} ou uma estrutura que envolva uma sinalização de Ca^{2+} ;
- (ii) O local de interacção deve exhibir uma ligação muito fraca ao Ca^{2+} , no entanto o efeito biológico global da deslocação deste tem de ser de elevada relevância biológica;
- (iii) O mecanismo de interacção deve exhibir propriedades moleculares, permitindo a diferenciação da energia térmica por oposição à energia proveniente dos campos magnéticos.

1.4.2. Expressão genética

A expressão genética diferencial é o componente central, comum a todos os sistemas biológicos, que permite a resposta correcta sob condições normais assim como a adaptação a condições de stress (incluindo a exposição aos campos magnéticos) (El May et al., 2009). Foram referidas possíveis alterações da expressão genética relativamente à apoptose (Dini e Abbro, 2005; Tenuzzo et al., 2009; Jajte et al., 2002; Miyakoshi et al., 2005; Potenza et al., 2004b), às proteínas do choque térmico (Chow e Tung, 2000; Li et al., 2001; Carlo et al., 2002; Miyakawa et al., 2001; Lin et al., 1997; Pipkin et al., 1999) e aos indicadores de stress (El May et al., 2009) devido à exposição a campos magnéticos.

A apoptose, uma forma distinta de morte celular, é executada e regulada por vários grupos de proteínas. A família de proteínas bcl-2 é o principal regulador do processo apoptótico, actuando quer como inibidor quer como promotor (Yokoyama et al., 2002). Os membros da família bcl-2 pró- e anti-apoptóticos devem funcionar em harmonia para manter a regulação da maquinaria apoptótica, os seus níveis são determinantes para destino celular (Nuñez e Clarke, 1994). Existem muitos outros genes, tais como p53 e bax, assim como os genes relativos às proteínas de choque térmico (ex: hsp70) que estão envolvidos na regulação da apoptose (Hofseth et al., 2004; Tenuzzo et al., 2009). Até à data, poucos dados têm sido publicados sobre os efeitos dos campos magnéticos na expressão genética em geral, e nos genes relacionados com a apoptose em particular (Tenuzzo et al., 2009).

Tenuzzo et al. (2009) induziu a apoptose em linfócitos humanos (isolados há 1 dia e há 5 dias) e expôs os mesmos a um campo magnético de 6 mT. Observou dois efeitos principais:

- (i) Modulação da expressão de genes relacionados com a apoptose (bcl-2, bax, p53 e hsp70);
- (ii) Maior sensibilidade das células mais antigas.

Os campos de intensidade moderada utilizados por Tenuzzo et al. (2006 e 2009) e Jajte et al. (2002) por si só não interferiam com a taxa de proliferação ou de morte celular, nomeadamente com a apoptose. Contudo, verificou-se que os campos magnéticos podem induzir dramáticas alterações na resposta de morte celular quando as células estão simultaneamente expostas a campos magnéticos e a drogas que se sabe induzirem a apoptose, demonstrando um efeito sinérgico (Tenuzzo et al., 2009; Jajte et al., 2002). A

extensão variável do aumento vs diminuição da expressão dos genes apoptóticos, sugere um complexo, ainda não completamente elucidado, processo metabólico após a exposição a campos magnéticos de 6 mT (Tenuzzo et al., 2009).

Os dados publicados relativamente ao efeito dos campos magnéticos na expressão de proteínas do choque térmico são equívocos. As dificuldades em interpretar os dados podem ser ilustradas através de estudos em que usaram as células HL60 (leucemia promielocítica humana) para investigar a expressão das proteínas de choque térmico. Pipkin et al. (1999) descobriram que a intensidade do campo magnético é um factor importante: 1mT activa uma resposta das proteínas de choque térmico, enquanto 100 μ T é insuficiente. Em contraste, Lin et al. (2001) encontraram um efeito a intensidades muito baixas (8 μ T), e Miyakoshi (2000) não encontrou nenhum efeito com intensidades superiores a 50 mT.

A resposta celular aos campos magnéticos de diferentes intensidades pode ser afectada por diversos factores, incluindo a intensidade e duração da exposição ou o tipo celular usado para aceder à resposta. Actualmente não é possível prever qual o factor ou combinação de factores que podem desencadear uma resposta biológica (Coulton et al., 2004). Existem vários estudos (Chow e Tung, 2000; Li et al., 2001; Carlo et al., 2002; Miyakawa et al., 2001; Lin et al., 1997; Pipkin et al., 1999) que relataram, tal como Pipkin et al. (1999) e Li e Chow. (2001) alterações na expressão das proteínas de choque térmico, numa gama variada de tipos celulares, após a exposição a diferentes campos magnéticos. Outros tal como Miyakoshi et al. (2000; 2005) (Kang et al., 1998; Morehouse and Owen, 2000; Shi et al., 2003; Bodega et al., 2005) não encontraram evidências de que a exposição a diferentes campos magnéticos induzisse a expressão de genes que codificam para as proteínas do choque térmico. Como forma de sensibilização celular Coulton et al. (2004) expuseram as células a 40°C, mas não obteve alterações na expressão genética devido à exposição ao campo magnético.

El May et al. (2009) observaram uma super-expressão dos genes *rpoA*, *katN* e *dnaK* após 10 horas de exposição a campos magnéticos de 200 mT, a mesma super expressão foi observada por Chow e Tung (2000) e Del Re et al. (2006). A super-expressão dos genes *rpoA*, *dnaK* e *katN* sugere um estado de stress das células quando expostas ao campo magnético (El May et al., 2009).

Os resultados contraditórios encontrados na bibliografia sobre os efeitos dos campos magnéticos na expressão genética podem dever-se a variadas condições experimentais tais como o tempo de exposição, intensidade e gradiente dos campos aplicados (Tenuzzo et al., 2009). Por exemplo, Hirose et al. (2003) observaram que a exposição a um campo homogêneo de 10 T foi incapaz de alterar a expressão dos genes c-Jun, c-Fos e c-Myc, enquanto um campo magnético não homogêneo de 6 T aumentou de forma significativa a expressão de c-Jun, utilizando tempo de exposição mais longo.

1.4.3. Morfologia Celular

As modificações na configuração das células e na membrana plasmática como consequência dos campos magnéticos já foram observadas em vários tipos celulares (Hamada et al., 1989; Paradisi et al., 1993; Santoro et al., 1997; Lisi et al., 2000; Chionna et al., 2003; Rieti et al., 2004).

Tem-se demonstrado que a exposição de neurónios a campos magnéticos acima de 5T levam à contracção das células neuronais, retracção da neurite e eventualmente à morte celular (Prina-Mello et al., 2006; Valiron et al., 2005). Contudo, segundo Khodarahmi et al. (2010) a viabilidade de astrócitos expostos por mais de 3 dias a 2.1T permaneceu intacta. Esta discrepância pode estar relacionada com variados factores, por exemplo o baixo campo magnético usado por Khodarahmi et al. ou os diferentes tipos celulares utilizados.

Os microtúbulos e os filamentos de actina estão entre as estruturas celulares que possuem características diamagnéticas. Foi demonstrado experimentalmente que os mesmos se alinham *in vitro* quando expostos a campos magnéticos acima de 5 (Bras et al., 1998) e 12T (Torbet e Dickens, 1984). Dessa forma, foram considerados como possíveis alvos celulares de campos magnéticos fortes (Valiron et al., 2005). Como os astrócitos diferem das células neuronais ao nível destas macromoléculas, podem-se esperar diferentes reacções dos astrócitos aos campos magnéticos quando comparados com os neurónios (Khodarahmi et al., 2010).

A exposição de *Escherichia coli* e *Paracoccus denitrificans* a um campo magnético de 10 mT (Fojt et al. 2009), ambas durante uma hora, não revelaram quaisquer alterações na proliferação nem na morfologia celular (Bodega et al., 2005). Já a exposição a campos magnéticos de 300mT alteram a proliferação de *Escherichia coli*.

1.4.4. Viabilidade e Crescimento Celular

Strašák et al. (2002) verificaram que os campos magnéticos (2.7 – 10 mT durante 0 – 12min.) podem afectar a bactéria *Escherichia coli*, não existindo diferenças significativas entre o efeito de um campo homogéneo ou não-homogéneo. O efeito observado não é bacteriostático, dado que o número de bactérias aumenta durante a exposição da cultura ao campo magnético, mas esse aumento é menor que o verificado na cultura controlo. Os resultados obtidos por Fojt et al. (2007) estão de acordo com os Strašák et al., no entanto, Fojt et al. (2007) encontraram diferenças entre estirpes bacterianas Gram positivas e Gram negativas. O número de unidades formadoras de colónias (UFC) diminui cerca de 20% nas estirpes Gram positivas e cerca de 30-40% nas estirpes Gram negativas quando expostas a um campo magnético de 10 mT durante 24 minutos. Já Aldinucci et al. (2003) e Wiskirchen et al. (1999) afirmam que os campos magnéticos superiores a 5T têm um efeito residual ou nulo no crescimento celular.

Os resultados obtidos por Strašák et al. (2002) demonstram que os campos magnéticos não possuem efeito no metabolismo, o menor crescimento de *Escherichia coli* quando exposta a campos magnéticos deve-se à morte celular de uma parte das bactérias. Já Motta et al. (2001), verificaram um aumento da actividade metabólica, e consequentemente no crescimento de *Saccaromyces cerevisae* quando exposta a um campo magnético de 220 mT durante 12 horas (Motta et al., 2001; Motta et al., 2004). Um resultado contrário foi observado aquando da exposição de *Saccaromyces cerevisae* a 110 mT durante 22 horas, nestas condições tanto a taxa metabólica como o crescimento de *Saccaromyces cerevisae* diminuem (Motta et al., 2001).

1.4.5. Fotossíntese

Os resultados obtidos por Hirano et al. (1998) sugerem que os campos magnéticos aceleram a excitação da clorofila, a produção de pares de radicais, as reacções de transferência de electrões, e a conversão de energia luminosa em energia química. Da mesma forma Takashi et al. investigaram a relação entre o crescimento da alga verde *Chlorella* e a intensidade de campo magnético, e concluíram que a activação luminosa da clorofila era superior a intensidades magnéticas abaixo dos 10 mT (Takashi et al., 1985). Em *Spirulina platensis* esta activação da excitação luminosa da clorofila está fortemente relacionada com o efeito dos campos magnéticos na concentração do pigmento

fotossintético ficocianina. Aparentemente os campos magnéticos não possuem nenhum efeito no conteúdo de clorofila e β -caroteno (Hirano et al. 1998). O conteúdo de ficocianina foi máximo com um campo de 10 mT, e diminuiu com o aumento de intensidade do campo magnético. Tendo em consideração a aceleração da evolução da taxa de O_2 durante a exposição aos campos magnéticos, deduziram que o aumento na quantidade de ficocianina possui um papel importante na activação do fotossistema II. Esta é uma das responsáveis pela activação das reacções de transferência electrónica durante a fotossíntese com intensidades de campo magnético acima dos 10 mT (Hirano et al. 1998).

O crescimento de *Spirulina platensis* foi inibido com um campo magnético de 40-70 mT mediado pelo declínio funcional da membrana de tilacóides, devido à inibição da síntese de gliceroglicolípidos, ficocianina e açúcares. O campo magnético não teve qualquer impacto quando *Spirulina platensis* foi cultivada de uma forma heterotrófica (Hirano et al. 1998).

1.4.6. Estudos com algas e cianobactérias

Poucos estudos foram conduzidos sobre o efeito dos campos magnéticos nas algas, e os que existem estão principalmente relacionados com a redução do crescimento de algas em piscinas ou com a filtração magnética da água (Wang et al., 2008).

Wang et al. (2008) observaram um aumento significativo no crescimento de *Chlorella vulgaris* (clorófito unicelular) quando exposta a campos magnéticos entre 10 e 35 mT. Com a exposição a intensidades entre 45 e 50 mT a diferença entre o crescimento das células expostas a campos magnéticos e o controlo diminuiu. Newman e Watson (1999) demonstraram que *Cladophora glomerata* (clorófito filamentosa) quando exposta a um campo magnético de 190 mT durante 28 dias diminuiu o seu crescimento, mas uma exposição de apenas 4 dias não induz qualquer efeito.

Li et al. (1998, 2007) observaram os efeitos dos campos magnéticos no crescimento da cianobactéria *Spirulina platensis*. Em ambos os testes, observaram-se diferenças no valor de campo que induz o crescimento máximo. As observações efectuadas por Li et al. (1998) indicam o crescimento máximo com um valor de campo de 250 mT, enquanto as observações descritas em 2007, indicam o crescimento máximo com um campo de 10 mT, sendo o crescimento inibido acima dos 40 mT, estando estas últimas em concordância com o observado por Hirano et al. (1998).

1.5.Controvérsia dos resultados

As células e os organismos possuem a capacidade de responder a um amplo espectro de estímulos ambientais e de stress, incluindo os campos magnéticos, através de alterações intra e extra-celulares (Saffer e Phillips, 1996). As alterações podem ser classificadas de irreversíveis vs reversíveis ou estruturais vs funcionais. As modificações celulares e moleculares existentes devido à interacção dos campos magnéticos com o material biológico são, contudo, dependentes da duração e tipo de exposição, da penetração nos tecidos, da geração de calor, que por sua vez está relacionada com a intensidade e frequência do campo magnético e do tipo de células expostas (Dini e Abbro, 2005; Cossarizza et al., 1989; Walleczek e Liburdy, 1990).

São poucos os estudos existentes relativamente ao efeito dos campos magnéticos a nível celular, o que dificulta uma avaliação clara. Os estudos publicados até ao momento variam na intensidade do campo, no tempo de exposição e também no tipo de células utilizado, o que impossibilita uma comparação directa entre os mesmos (Miyakoshi et al., 2005). Muitas das tentativas existentes de reprodução dos resultados observados foram infrutíferas (Repacholi e Greenebaum, 1999). A exposição aos campos magnéticos não é um factor de stress universal como a temperatura (Coulton et al., 2004), pode ser necessária a sensibilização celular para a observação de efeitos biológicos devido à exposição ao campo magnético, ou para ampliar os efeitos existentes (Junkersdorf et al., 2000; Gutzeit, 2001). É contudo necessário um conhecimento total dos efeitos biológicos (positivo ou negativo) dos campos magnéticos nos organismos vivos (Dini et al., 2005).

1.6. Âmbito e motivação da investigação

Apesar da existência de vários estudos sobre o efeito do campo magnético em diferentes tipos celulares e organismos, ainda não existem estudos que permitam a comparação de resultados. Os estudos existentes focam diferentes efeitos, em diferentes tipos celulares e utilizando diferentes campos magnéticos. Torna-se assim necessário um estudo onde se possa comparar o efeito de várias intensidades de campo magnético num dado tipo celular, e onde também se comparem os efeitos de determinada intensidade de campo magnético em tipos celulares diferentes. Outra lacuna na maioria dos estudos existentes é a falta de controlo das condições externas. O campo magnético não é um factor de stress universal (Coulton et al., 2004) e torna-se essencial que todos os estudos tenham condições bem definidas e controladas.

Este trabalho teve como objectivo inicial estabelecer um protocolo e condições experimentais adequadas à avaliação do efeito de campos magnéticos de várias intensidades (50, 100, 200 e 250 mT) no crescimento e morfologia de três espécies, representando grupos distintos dentro das clorófitas: *Spirogyra sp.*, *Pandorina morum*, *Pediastrum duplex*. Através dos dados recolhidos pretende-se ainda definir um valor mínimo de intensidade de campo magnético para a existência de alterações no crescimento. Verificar se existe uma relação entre os diferentes tipos de clorófitas e o efeito causado e finalmente perceber se é necessário algum tipo de sensibilização celular para que se observarem efeitos nas diversas espécies. Os dados recolhidos durante este estudo fazem parte de um estudo mais aprofundado que pretende identificar alterações na taxa fotossintética de algumas clorófitas devidas à exposição aos campos magnéticos.

2. Material e métodos

2.1. Material biológico

O termo algas designa um conjunto polifilético de organismos predominantemente fotossintéticos com variadíssimas morfologias, que não se adequa a uma classificação filogenética moderna (anexo II). Estima-se existirem cerca de 1 a 10 milhões de espécies de algas (Barsanti e Gualtieri, 2006), que contribuem com aproximadamente 40-50% do oxigénio da atmosfera, sendo na sua maioria micro algas (Barsanti e Gualtieri, 2006). Em termos económicos, as algas representam aproximadamente 22% dos 39.4 milhões de toneladas métricas dos produtos de aquacultura vendidos em todo o mundo (Andersen, 2005). Muitas algas de água doce são utilizadas como bioindicadores devido à sua resposta rápida e previsível a alterações ambientais (Bellinger e Singer, 2010).

Neste estudo utilizaram-se três espécies dulçaquícolas pertencentes à divisão clorófita, *Spirogyra sp.*, *Pediastrum duplex* Meyen e *Pandorina morum* (O. F. Müller) Bory (quadro 2). As algas verdes (clorófitas) são um dos grupos mais diversificados dos eucariotas caracterizadas pela presença de cloroplastos com duas membranas, tilacóides empilhados e clorofilas a e b. Encontram-se distribuídas por todo o mundo e podem ser encontradas em praticamente todo o tipo de habitat das regiões do ártico ao antártico, dos oceanos aos lagos de água doce, assim como em solos de áreas temperadas e áridas. Acredita-se que as plantas terrestres derivam directamente de um grupo de clorófitas de água doce (Barsanti e Gualtieri, 2006).

2.1.1. *Spirogyra sp.*

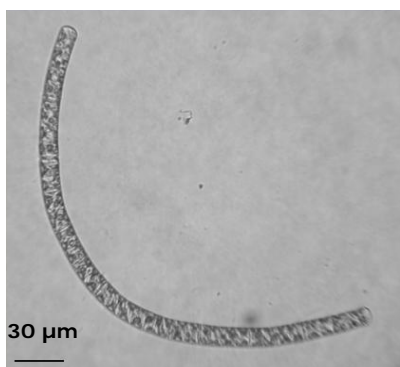


Figura 2 – Fotografia de *Spirogyra sp.* utilizando microscopia óptica (Zeiss Axiovert S100 TV equipado com uma sensicam 12 Bit Cooled Imaging).

Spirogyra sp. (figura 2) ocorre numa grande variedade de habitats, onde se encontra tipicamente ligada a um substrato estável ou como um manto flutuando livremente (Lembi et al., 1988). A espécie utilizada neste estudo, possui células cilíndricas, com um diâmetro de aproximadamente 15 µm e cerca de 35 µm de comprimento, que se juntam nas extremidades para formar um filamento não ramificado. As paredes celulares são firmes, com um septo plano e possui uma

camada de mucilagem no exterior, dando-lhe uma superfície viscosa. Possui apenas um cloroplasto com formato em hélice. O núcleo é normalmente visível e encontra-se no centro da célula. Os filamentos podem ser fragmentados, originando-se um novo filamento a partir de cada fragmento. A reprodução sexuada na *Spirogyra* ocorre através da conjugação entre células de filamentos diferentes e resultam na produção de um zigoto resistente. Para a identificação da espécie é essencial a observação do zigoto (Bellinger e Singer, 2010; Transeu, 1951).

2.1.2. *Pandorina morum*

As colónias de *Pandorina morum* (figura 3), comuns no plâncton, possuem uma forma esférica com 16 células densamente empacotadas. As células encontram-se envolvidas numa banda larga de mucilagem através da qual sobressaem dois flagelos de cada célula. As células podem-se dividir e formar colónias filhas que depois se libertam (Bellinger e Singer, 2010). *Pandorina morum* encontra-se na lista de Palmer (1969) das 10 espécies mais tolerantes à poluição orgânica.

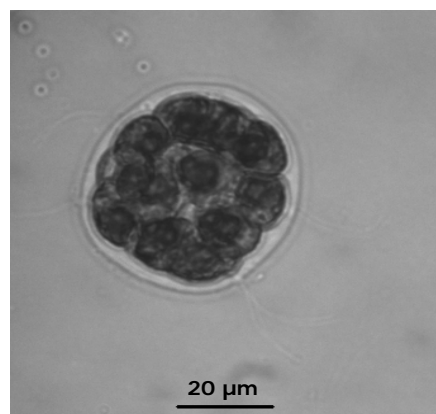


Figura 3 – Fotografia de *Pandorina morum* utilizando microscopia óptica (Zeiss Axiovert S100 TV equipado com uma sensicam 12 Bit Cooled Imaging).

2.1.3. *Pediastrum duplex*

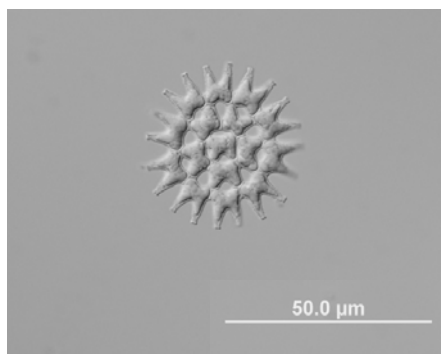


Figura 4 – Fotografia de *Pediastrum duplex* utilizando microscopia óptica de contraste interferencial (Zeiss Axioplan 2 imaging, equipado com uma câmara Olympus DP70).

Pediastrum duplex (figura 4) é uma alga colonial planctónica que forma placas circulares (Bellinger e Singer, 2010), encontra-se em águas paradas, como lagos, de uma grande variedade de habitats ricos em nutrientes (Bellinger e Singer, 2010). A parede celular contém polímeros de ácidos gordos e alguma sílica, sendo por isso muito resistente e persistindo por algum tempo após o conteúdo ter desaparecido (são das poucas algas verdes com registos fósseis) (Gelin et al., 1997).

Quadro 2 – Lista de espécies utilizadas e respectivas características

Espécie	Estirpe	Origem	Características
<i>Spirogyra sp.</i>	ACOI strain:2538 (Santos, M.)	Moncorvo, Portugal (2004)	Filamentosa; Filamentos sem ramificações; Cloroplastos em hélice;
<i>Pediastrum duplex</i>	(Calado, S.)	Charcos artificiais em Aveiro, Portugal (2009)	Colonial; Flagelada apenas durante a formação de novas colónias;
<i>Pandorina morum</i>	(Calado, S.)	Charcos artificiais em Aveiro, Portugal (2009)	Colonial; Todas as células são flageladas;

2.2. Condições de cultura

As diferentes espécies utilizadas foram escolhidas não apenas pelas suas características particulares, descritas anteriormente, mas também pela sua disponibilidade em cultura e rápido crescimento. Todas as culturas foram mantidas num espaço criado para o efeito (figura 5) a uma temperatura de 20 ± 1 °C (manteve-se a temperatura recorrendo ao uso de ar condicionado), com um ciclo de luz/escuro de 13/11 horas e com uma intensidade de aproximadamente $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A *Spirogyra sp.* foi cultivada em meio LC oligo (anexo III), enquanto que *Pediastrum duplex* e *Pandorina morum* foram cultivadas em meio L16 suplementado com vitaminas (anexo III). Repicaram-se regularmente as culturas stock, a crescer em frascos T, de forma a providenciar uma fonte contínua de células a crescer a uma taxa razoavelmente constante.



Figura 5 – Fotografia do espaço de cultura.

2.3. Descrição do dispositivo experimental

O campo magnético aplicado às amostras foi produzido por um electroímã arrefecido (figura 7) através da circulação de ar nas bobinas, este sistema permite manter a temperatura estável nos pólos, ou seja no local da amostra. Este sistema funcionou com dois tipos de iluminação, através de LED (díodo emissor de luz) e iluminação fluorescente, dependendo da amostra a testar, mas em ambos os casos com uma intensidade de aproximadamente $16 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As características do electroímã, homogeneidade do

campo magnético e temperatura no local da amostra foram testadas para as diferentes intensidades de campo magnético utilizadas.

Foi criado um espaço de controlo (figura 6), com condições de luz e temperatura semelhante ao espaço de cultura. Tanto no electroímã como no espaço controlo foi utilizado um sistema de termopares para medir a temperatura. Todo este sistema foi montado e optimizado numa sala fechada, com a temperatura controlada através da utilização de ar condicionado, no laboratório de materiais não cristalinos do departamento de Física da Universidade de Aveiro pelo professor Sushil Kumar Mendiratta e pelo Eng.º Mestre Jorge Monteiro.



Figura 7 – Fotografia do electroímã utilizado para aplicar o campo magnético nas amostras. Pode-se observar uma placa com amostras entre os pólos e a iluminação utilizando LEDS.

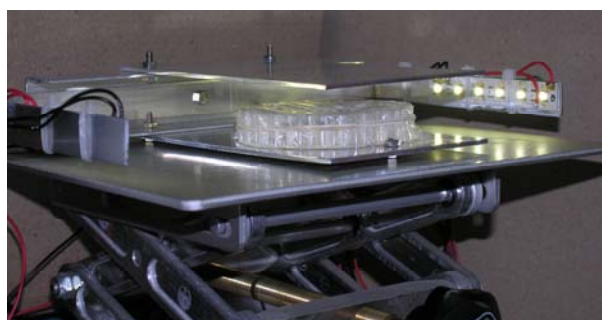


Figura 6 – Espaço controlo com iluminação de LEDS.

2.4.Procedimento experimental

2.4.1.*Spirogyra sp.*

Cortaram-se placas de 96 poços com um formato redondo, semelhante ao dos pólos do electroíman. Lavaram-se e esterilizaram-se as caixas através de luz ultra-violeta. Retiraram-se vários filamentos da cultura stock e cortaram-se, com a ajuda de pequenos pedaços de vidro, de forma a ficarem com tamanhos que variaram entre 1 a 5 células. Cada filamento foi colocado num dos poços das duas placas e preencheu-se cada poço com meio semi-sólido LColigo (Popovsky e Pfiester, 1990) (espesado através da adição de 3% de agar). Cobriram-se as placas com película aderente, de forma a evitar a evaporação e manter a passagem de luz. Colocou-se uma das placas no electroíman com um campo magnético 0 mT (controlo) com iluminação de LEDS e outra no espaço controlo com iluminação fluorescente. Efectuaram-se observações diárias recorrendo a um microscópio invertido (Zeiss Axiovert S100 TV) e utilizando ampliações de 320 ou 500 ×, registou-se o número de células em cada filamento, assim como as células em que ocorreu mitose. Utilizando uma sensicam (12 Bit Cooled Imaging) adaptada ao microscópio efectuou-se um registo fotográfico das células que sofreram mitose. Esta observação ocorreu apenas em 3 mitoses consecutivas, pois só se conseguem manter os filamentos de *Spirogyra sp.* fixos no porta-amostras enquanto estes possuem tamanhos reduzidos (até cerca de 20 células). Definiu-se um tempo máximo de teste de 1 mês, por questões logísticas. Repetiu-se o procedimento utilizando diferentes iluminações. E posteriormente utilizando diferentes campos magnéticos, com intensidades de 50, 100 e 250 mT e iluminação LED, enquanto se utilizou iluminação fluorescente no espaço controlo. Apenas existe um electroíman e portanto não é possível correr mais de uma experiência em simultâneo. Durante a observação ao microscópio foi também registada a existência de alterações morfológicas.

2.4.2. *Pediastrum duplex* e *Pandorina morum*

A avaliação dos efeitos do campo magnético nas espécies *Pediastrum duplex* e *Pandorina morum* efectuou-se segundo o mesmo protocolo e em paralelo. Cortaram-se placas de 24 poços ao meio de forma a se ajustarem ao tamanho dos pólos, seguidamente lavaram-se e esterilizaram-se as mesmas recorrendo à utilização de luz ultra-violeta. Das culturas stock (*Pediastrum duplex* e *Pandorina morum*) retirou-se 0,5 mL de cultura para cada um dos 7 poços das placas de cultura, 4 poços para as amostras colocadas no espaço controlo e 3 poços para as amostras colocadas no electroíman, e juntou-se 1,5 mL de meio L16 suplementado com vitaminas (Lindström, 1991). Fecharam-se as caixas com Parafilm, evitando dessa forma a evaporação. Colocaram-se as duas placas durante aproximadamente 5 dias (para entrarem na fase exponencial) nas mesmas condições que as culturas stock, após esse período transferiu-se a placa com apenas 3 amostras para o electroíman com um campo de 0 mT (controlo) e outra para o espaço controlo. Utilizaram-se lâmpadas fluorescentes na iluminação das amostras colocadas no electroíman, excepto nos testes preliminares. O procedimento de contagem celular foi adaptado de Guillard e Siereacki (2005), de 48 em 48 horas retiraram-se 100µL de cada uma das amostras que se diluíram em 900µL de água destilada. As amostras foram posteriormente fixadas com soluto de Lugol, seguidamente contaram-se recorrendo a uma câmara de Sedgwick-Rafter utilizando uma ampliação entre 100-200 ×. O procedimento foi repetido utilizando diferentes iluminações, e campos magnéticos com intensidades de 100, 200 e 250 mT com iluminação fluorescente. No teste preliminar, que compara a iluminação de fluorescência e os LEDS, as amostras utilizadas não tiveram o período de adaptação no espaço controlo para atingirem a fase exponencial. Regularmente efectuaram-se observações ao microscópio com o intuito de registar a existência de alterações morfológicas.

3.5. Técnicas de análise de dados

A taxa de crescimento foi calculada de duas formas, apenas para a fase exponencial das curvas de crescimento, utilizando a seguinte expressão (Guillard e Siereacki, 2005):

$$\mu = (\ln(N_f) - \ln(N_0)) / t$$

Onde: μ é a taxa de crescimento

N_f é a concentração final de colónias/mL

N_0 é a concentração inicial de colónias/mL

e através do declive da curva corresponde ao logaritmo neperiano da concentração das amostras.

Os valores de estimulação (%) foram calculados utilizando a seguinte expressão (Guillard e Siereacki, 2005):

$$S = (((\mu_i - \mu_c) / \mu_c) \times 100)$$

Onde: S é o valor da estimulação em percentagem

μ_i é a taxa de crescimento da amostra exposta ao campo magnético de intensidade i

μ_c é a taxa de crescimento da amostra controlo

Efectuou-se a análise estatística utilizando o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15 para o Windows. Testou-se a validade dos resultados utilizando a análise ANOVA e o teste t-student sempre com um intervalo de confiança de 95%.

3.Resultados e discussão

3.1 Características do electroíman

O electroíman foi desenhado de forma a conseguir minimizar o aquecimento provocado pela corrente eléctrica que circula na bobine. Através do gráfico da figura 8 pode-se verificar que até uma intensidade de campo magnético igual a 250 mT a diferença entre a temperatura nos pólos e na sala se mantém praticamente constante, o que não se verifica com intensidades superiores a 250 mT, sendo este o factor de restrição da intensidade de campo magnético utilizado nas várias exposições.

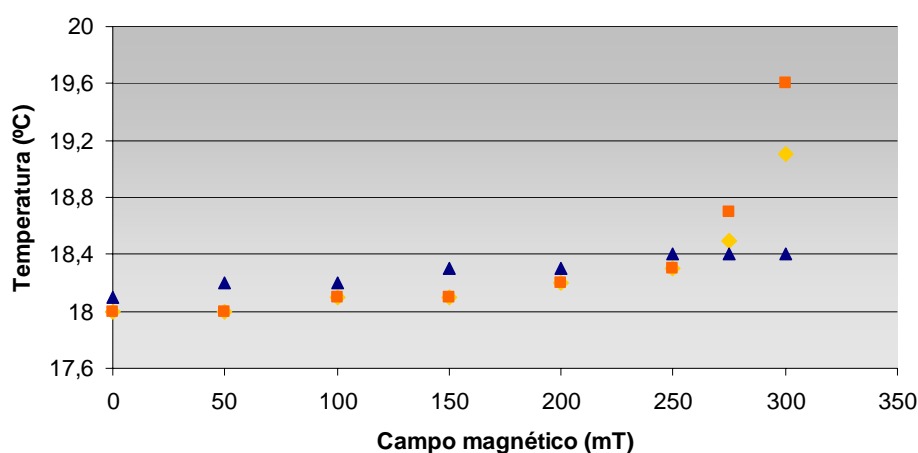


Figura 8 – Variação da temperatura no electroíman consoante a variação do campo magnético.

(▲) Temperatura da sala; (●) Temperatura no electroíman 15 minutos após a aplicação do campo magnético; (■) Temperatura no electroíman 30 minutos após a aplicação do campo magnético.

Foi também verificada a homogeneidade do campo magnético nos pólos para as diferentes intensidades de campo utilizadas. Na tabela 1 é possível verificar uma diminuição da homogeneidade do campo magnético nos pólos com o aumento da intensidade do mesmo. Verifica-se que à medida que o campo magnético vai aumentando de intensidade, as variações são superiores na periferia dos pólos. Os pólos possuem um diâmetro de cerca de 7 centímetros, e os poços utilizados para colocar as amostras ocupam no máximo 6 centímetros, ou seja dado que as amostras são sempre colocadas no centro dos pólos, nenhuma amostra fica sujeita à variação de intensidade de campo magnético observada nas extremidades. Os valores de variação até 3 centímetros do centro, local onde são colocadas as amostras, quando comparados com o valor de intensidade de campo

magnético no interior correspondem a menos de 15%. O campo magnético aplicado às amostras era contínuo uniforme.

Tabela 1 – Intensidade de campo magnético nos pólos do electroímã.

Centro	1cm do centro	2cm do centro	3cm do centro	3,5cm do centro
0 mT	0 mT	0 mT	0,5 mT	1 mT
50 mT	50,4 mT	51,5 mT	60 mT	85 mT
100 mT	100,3 mT	102 mT	110 mT	150 mT
200 mT	201 mT	205 mT	220 mT	270 mT
250 mT	252 mT	260 mT	280 mT	350 mT

Foram também medidos os valores de campo magnético no espaço de cultura e no espaço controlo, sendo os mesmos de 0,23 mT no espaço de cultura e de 0,065 mT no espaço controlo. Segundo Polk et al. (1996) o campo geomagnético possui valores entre 0,03 mT e 0,07 mT, ou seja o campo magnético no espaço de controlo está dentro dos valores de campo geomagnético.

3.2 Testes Preliminares de *Spirogyra sp.*

Spirogyra sp. é encontrada numa grande variedade de habitats (Lembi et al., 1988), dado que não necessita de condições específicas para o seu crescimento (Bellinger e Singer, 2010), é uma alga fácil de manter em cultura. Como não possui movimento próprio nem ramificações é ideal para estudos dos efeitos direccionais do campo magnético. Os seus cloroplastos em forma de hélice são um alvo para a observação de alterações morfológicas.

Inicialmente tentou-se obter curvas de crescimento para *Spirogyra sp.* através do aumento de tamanho das células. Fotografaram-se as células com a sensicam adaptada ao microscópio invertido e posteriormente mediam-se as diferentes células. Este procedimento foi abandonado devido à inexistência de um software que possibilitasse a medição do tamanho celular automaticamente, conseguindo assim uma análise menos morosa e com um maior número de indivíduos.

Foram realizados vários testes com o intento de comparar o crescimento de *Spirogyra sp.*, no espaço controlo e no electroíman, exposta a um campo de intensidade de 0 mT com dois tipos distintos de iluminação (LEDs brancos e lâmpadas fluorescentes). As lâmpadas fluorescentes são a iluminação comumente utilizada em culturas de algas. Os LEDs por sua vez representam um tipo de iluminação que produz menos calor, mais pequeno e por isso mais facilmente adaptável ao electroíman, tendo ainda a potencialidade de utilizar comprimentos de onda mais específicos. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa (intervalo de confiança de 95%) no tempo médio entre mitoses das amostras com a iluminação LED comparando com as amostras com uma iluminação fluorescente (gráfico da figura 9). Foi observado um tempo entre mitoses menor, ou seja um crescimento superior das amostras com iluminação fluorescente.

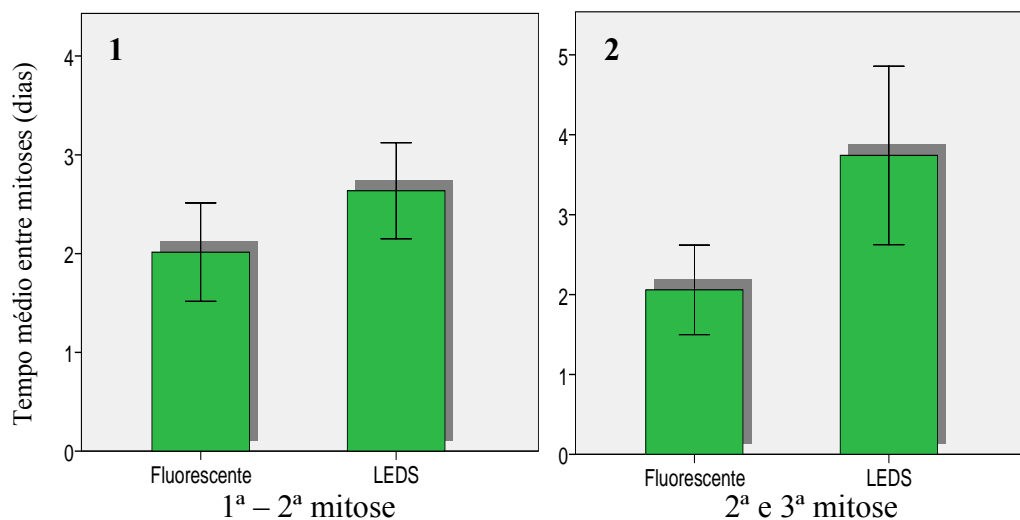


Figura 9 – Tempo médio entre duas mitoses em *Spirogyra sp.* com diferentes iluminações, LEDS e Fluorescente.

Nas experiências realizadas para comparação do crescimento de *Spirogyra sp.* quando exposta a diferentes campos magnéticos utilizou-se iluminação LED com uma intensidade luminosa de $16 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. No espaço controlo utilizou-se iluminação fluorescente com uma intensidade luminosa de $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para controlo utilizaram-se as amostras no electroímã com um campo magnético de intensidade 0 mT.

3.3 Efeito do campo magnético sobre a mitose em *Spirogyra sp.*

Para facilitar a interpretação de resultados, as várias experiências estão esquematizadas na tabela seguinte (tabela 2).

Tabela 2 – Valores de campo magnético no espaço controlo e no electroíman durante o decorrer das várias experiências.

Experiência	Campo electromagnético	
	Espaço controlo	Electroíman
1	0,065 mT	0 mT
2	0,065 mT	50 mT
3	0,065 mT	100 mT
4	0,065 mT	250 mT

A exposição a campos magnéticos de várias intensidades revela um aumento no tempo médio entre duas mitoses consecutivas, ou seja um decréscimo no crescimento (gráficos da figura 10). Utilizando o teste ANOVA, com um intervalo de confiança de 95 %, verificou-se que os tempos médios entre mitoses são estaticamente diferentes. O tempo entre a 1ª e a 2ª mitose aumentou de uma média de 2.46 dias com um campo magnético de intensidade 0 mT, para 4.59 dias com uma intensidade de 50 mT, 6.41 dias com uma intensidade de 100 mT e 17.25 dias com uma intensidade de 250 mT. Já o tempo entre a 2ª e terceira mitose aumentou de uma média de 3.47 dias com um campo magnético de intensidade 0 mT, para 5.15 dias com uma intensidade 50 mT e para 6.18 dias com uma intensidade de 100 mT. Não se observou o tempo entre a 2ª e 3ª mitose com 250 mT, pois esta observação ultrapassaria o limite de 1 mês por experiência.

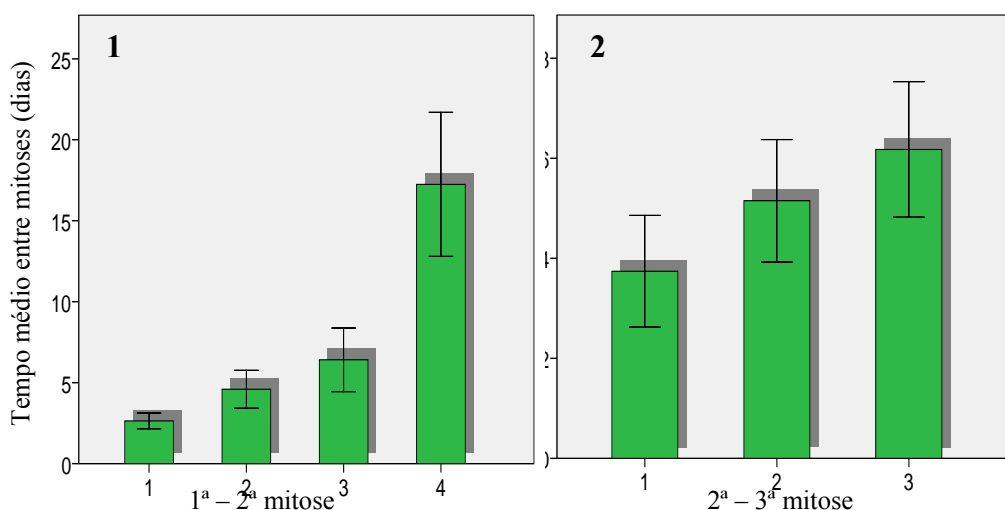


Figura 10 – Tempo médio entre duas mitoses consecutivas em *Spirogyra sp.* em função da intensidade de campo magnético aplicado (mT).

De forma a averiguar se as alterações entre as várias experiências se devem a variações externas ao campo magnético mantiveram-se amostras no espaço controlo, com diferença na iluminação, utilizando uma iluminação fluorescente e de menor intensidade (gráfico da figura 11). Realizando o teste de ANOVA, com um intervalo de confiança de 95 %, não se observaram diferenças significativas entre as várias experiências. Verifica-se assim, que as possíveis variações externas ao campo magnético existentes não afectaram o crescimento de *Spirogyra sp.*.

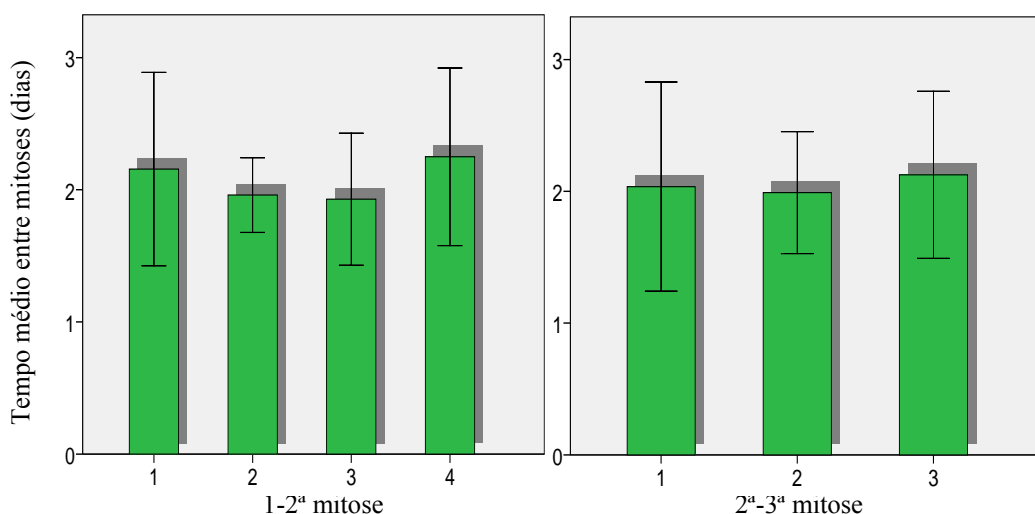


Figura 11 – Tempo médio entre duas mitoses consecutivas em *Spirogyra sp.* no espaço de controlo em cada uma das diferentes experiências..

As alterações encontradas no crescimento das amostras expostas no electroímã devem-se ao efeito do campo magnético. Alguns autores referem a necessidade de existir um factor de sensibilização para se poderem observar os efeitos do campo magnético (Junkersdorf et al., 2000; Gutzeit, 2001), estudos posteriores poderão revelar se a iluminação através de LEDS serviu como factor de sensibilização.

Strašák et al. (2002) refere que a diminuição do crescimento de *Escherichia coli* quando exposta a campos magnéticos se deve à morte celular de uma parte das bactérias. No estudo actual observam-se as células individualmente, podendo identificar com toda a segurança se a consequência da aplicação de campo magnético é a diminuição de crescimento ou a morte de uma parte das células. Dado que não se observou morte celular nas amostras, pode-se portanto afirmar que o efeito é definitivamente de diminuição do crescimento.

3.4 Testes Preliminares de *Pandorina morum*

Pandorina morum é uma alga colonial, que possui dois flagelos por célula podendo movimentar-se livremente (Bellinger e Singer, 2010). Estas características permitem que numa amostra exposta a um campo magnético as colónias se movimentem, assegurando indirectamente, a homogeneidade do campo magnético aplicado á amostra. A movimentação através dos flagelos é por si só um alvo para a influência do campo magnético devido às potenciais alterações de cálcio.

Foram realizados vários testes de forma a comparar o crescimento de *Pandorina morum* no espaço controlo e no electroíman. Esta foi exposta a um campo de intensidade 0 mT, com dois tipos distintos de iluminação, LED brancos e lâmpadas fluorescentes. Os vários testes vieram não só demonstrar que o crescimento de *Pandorina morum* é bastante reduzido com a utilização de LEDS mas também que existem diferenças estatisticamente significativas entre o crescimento no electroíman com um campo magnético de intensidade 0 mT e no espaço controlo (gráficos da figura 12). Diferenças estas relacionadas com a diferença de intensidade luminosa nos dois locais.

Recorrendo ao teste t-student, com um intervalo de confiança de 95%, verificaram-se as diferenças no crescimento de *Pandorina morum* consoante o tipo de iluminação e o local de crescimento. Ao comparar o crescimento de *Pandorina morum* sujeita a uma iluminação fluorescente, no espaço controlo, com o crescimento da mesma sujeita a uma iluminação utilizando LEDS, no electroíman, observa-se uma diferença estatisticamente significativa a partir das 74 horas (gráfico 1 da figura 12). Comparando o crescimento de *Pandorina morum* no espaço controlo e no electroíman, ambos com iluminação LEDS, observa-se uma diferença estatisticamente significativa após 218 horas (gráfico 2 da figura 12). Com a utilização de iluminação fluorescente em ambos os locais, a diferença é estatisticamente significativa a partir das 126 horas (gráfico 3 da figura 12). É interessante observar que no teste relativo à iluminação com LEDS nos dois locais se verifica um maior crescimento no espaço controlo, mas no teste com iluminação fluorescente ocorre o inverso, o crescimento é superior no electroíman.

Nota-se que as diferenças relacionadas com o tipo de iluminação são mais significativas que as observadas entre o espaço controlo e o electroíman utilizando o mesmo tipo de iluminação com intensidades luminosas diferentes.

Os resultados descritos anteriormente deixam clara a existência de diferenças entre a taxa de crescimento no espaço controlo e no electroíman, independente do tipo de iluminação utilizada. Pequenas diferenças de temperatura (menores que 0,5 °C) entre os dois espaços podem ser um factor adicional de variação. Repacholi e Greenebaum (1999) que definiram as condições ideais para o estudo dos efeitos dos campos magnéticos, referem que é aconselhável utilizar dois electroímans em que se possa reverter a corrente, não produzindo campo magnético mas criando condições semelhante às existentes na amostra sujeita ao campo magnético. Actualmente apenas existe um electroíman, tendo-se optado por considerar como controlo a amostra que se colocou no electroíman com campo 0 mT.

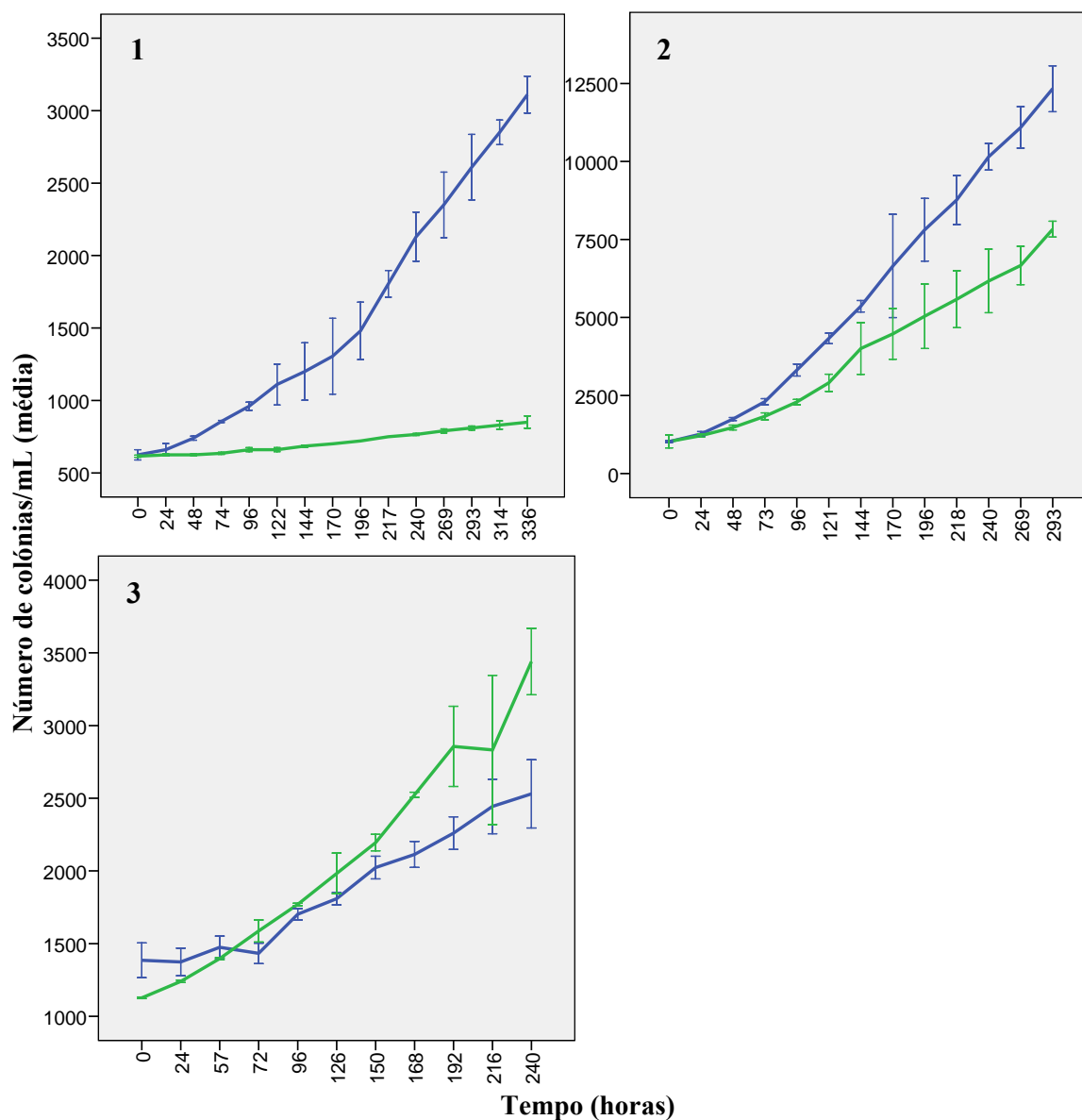


Figura 12 – Curvas de crescimento obtidas para *Pandorina morum* quando exposta a diferentes iluminações no espaço de controle e no electroíman com um campo de 0 mT. Os valores representam a média do número de colônias por mililitro e as barras o coeficiente de variação (desvio padrão). **1** – Iluminação com luz fluorescente no espaço de controle (azul) e iluminação com LED no electroíman (verde); **2** – Iluminação com LED (azul – amostras no espaço de controle; verde – amostras no electroíman); **3** – Iluminação com luz fluorescente (azul – amostras no espaço de controle; verde – amostras no electroíman).

3.5 Efeito do campo magnético no crescimento de *Pandorina morum*

Considerou-se como controlo as amostras expostas no electroíman com campo magnético de 0 mT. Ainda assim foram colocadas amostras no espaço controlo em simultâneo com as amostras colocadas no electroíman.

Para facilitar a interpretação de resultados, as várias experiências estão esquematizadas na tabela seguinte (tabela 3).

Tabela 3 – Valores de campo magnético no espaço controlo e no electroíman durante o decorrer das várias experiências.

	Campo electromagnético	
	Espaço controlo	Electroíman
1	0,065 mT	0 mT
2	0,065 mT	100 mT
3	0,065 mT	200 mT
4	0,065 mT	250 mT

Ao observar isoladamente as taxas de crescimento (calculadas de acordo com o descrito na secção 3.5) das culturas expostas ao campo magnético (gráfico da figura 13), verificam-se alterações com a aplicação de um campo de intensidade 200 mT. As alterações ocorridas com intensidades de 100 e 250 mT não são estatisticamente significativas, o mesmo não ocorre com o aumento observado a 200 mT, neste caso a diferença entre a taxa de crescimento observada com 200 e com 0 mT é estatisticamente significativa. Ao observar as amostras que se encontram no espaço de controlo verificam-se variações semelhantes, uma diferença estatisticamente significativa na experiência 3 (onde se testou o efeito do campo magnético de 200 mT), enquanto nas experiências 2 e 4 (onde se testou o efeito do campo magnético de 100 e 250 mT, respectivamente) não se observam diferenças estatisticamente significativas. Os resultados descritos, demonstram a existência de no mínimo um factor de variação que não o campo magnético.

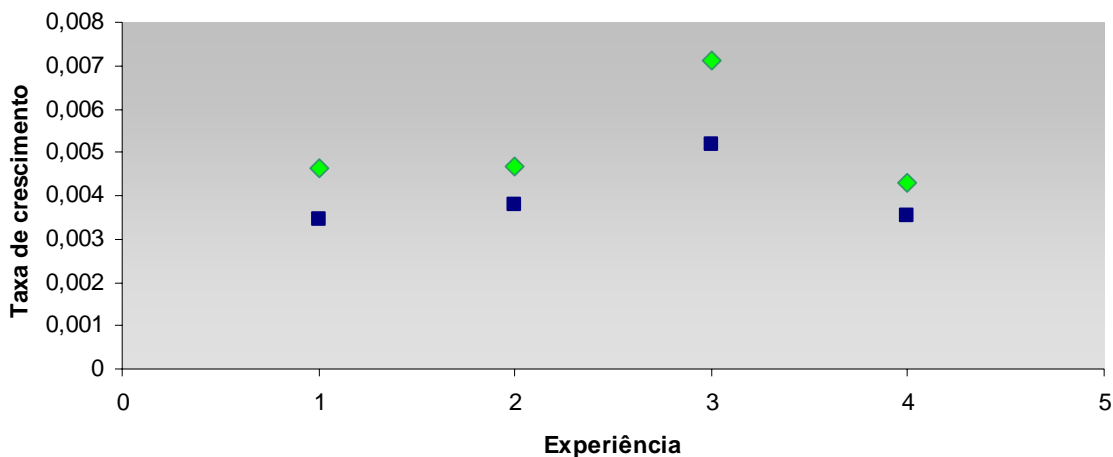


Figura 13 – Representação gráfica das taxas de crescimento médias de *Pandorina morum* durante as várias experiências no electroímã (♦) e no espaço de controlo (■)

As diferenças entre as taxas de crescimento, com campos magnéticos de várias intensidades em comparação com a taxa de crescimento com um campo magnético de intensidade 0 mT, podem se observar através da percentagem de estimulação, ou seja a estimulação que os campos magnéticos causam nas amostras comparando com o controlo. Na tabela 4 verificamos que com a aplicação de um campo magnético de intensidade 100 mT a estimulação média é de apenas de 1 %, ou seja, praticamente nula. Com um campo magnético de 200 mT a estimulação do crescimento é relativamente elevada, 54 %, e com a exposição a 250 mT existe uma inibição praticamente nula, 7 %. Em concordância com o observado anteriormente, também estes dados variam de forma semelhante nas amostras colocadas no espaço controlo, reforçando a ideia da existência de um factor de variação entre as diversas experiências que não a de intensidade de campo magnético. Dessa forma, a comparação entre as taxas de crescimento das amostras expostas a campos magnéticos de várias intensidades e as amostras expostas a um campo magnético de intensidade 0 mT, por si só, não permite tirar conclusões.

Tabela 4 – Índices de crescimento das amostras de *Pandorina morum* expostas a vários campos magnéticos de diferentes intensidades e das amostras colocadas no espaço controlo durante o mesmo período de tempo.

Amostras no electroíman	Taxa de Crescimento	Desvio Padrão	Estimulação (%) (mínimo – máximo)
1	$4,63 \times 10^{-3}$	$2,95 \times 10^{-4}$	
2	$4,69 \times 10^{-3}$	$1,45 \times 10^{-4}$	1 (-8 – 12)
3	$7,12 \times 10^{-3}$	$1,97 \times 10^{-3}$	54 (5 – 110)
4	$4,29 \times 10^{-3}$	$2,07 \times 10^{-4}$	-7 (-17 – 4)
Amostras no espaço controlo			
1	$3,46 \times 10^{-3}$	$6,89 \times 10^{-4}$	
2	$3,81 \times 10^{-3}$	$2,90 \times 10^{-4}$	10 (-15 – 48)
3	$5,16 \times 10^{-3}$	$7,26 \times 10^{-4}$	49 (8 – 112)
4	$3,55 \times 10^{-3}$	$5,32 \times 10^{-4}$	2 (-27 – 47)

Segundo Repacholi e Greenebaum (1999) é necessário existir igualdade de condições entre a amostra exposta e a amostra controlo, o que, como se verificou anteriormente, não ocorre. De forma a minimizar as variações externas existentes, considerando que as amostras no espaço controlo sofreram as mesmas variações, calculou-se a diferença entre as taxas de crescimento das amostras colocadas no espaço controlo e no electroíman (gráfico da figura 14). Os resultados apresentam uma ligeira diminuição da taxa de crescimento de *Pandorina morum* quando exposta a um campo magnético de intensidade 100 mT e 250 mT. No entanto, os resultados apresentam um aumento na taxa de crescimento quando exposta a 200 mT. Estes resultados sugerem a possível existência de um efeito de estimulação do crescimento de *Pandorina morum* com um campo magnético de intensidade 200 mT, mas um efeito de inibição quando exposta a campos magnéticos de intensidades 100 e 250 mT, sendo esta mais pronunciada no ultimo. Contudo, são imprescindíveis novos testes para confirmar os resultados descritos anteriormente.

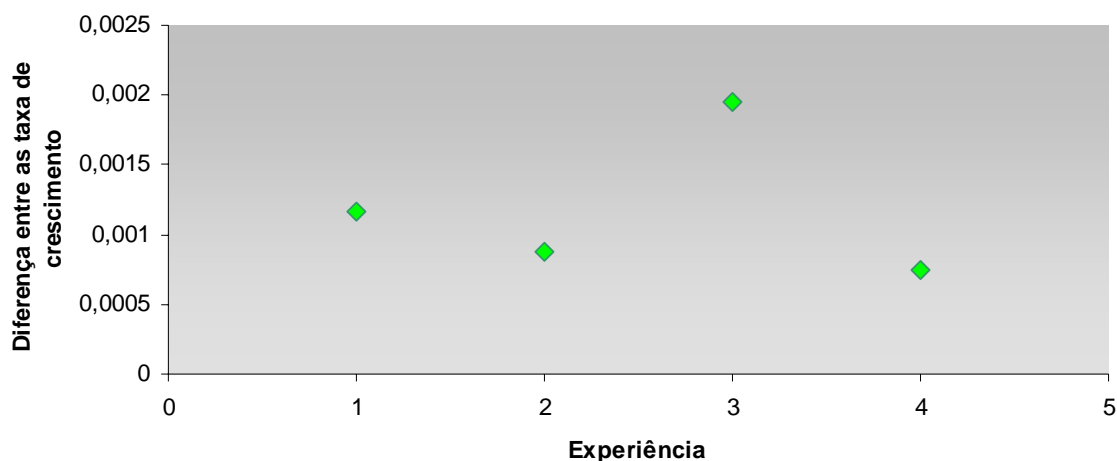


Figura 14 – Representação gráfica da diferença entre as taxas de crescimento das amostras de *Pandorina morum* no espaço controlo e as amostras colocadas no electroíman durante as diferentes experiências.

Como foi referido anteriormente e sugerido por Repacholi e Greenebaum (1999) um dos factores passíveis de causar a assimetria nas várias experiências é a temperatura, outros serão o estado da cultura, e a iluminação.

É possível estabelecer uma relação entre a variação da temperatura e as diferentes taxas de crescimento observadas durante a exposição de *Pandorina morum* a campos magnéticos de diferentes intensidades, assim como no espaço de controlo (gráfico da figura 15). Observa-se uma clara diminuição da taxa de crescimento com o aumento da temperatura, sendo esta mais evidente entre os testes efectuados a cerca de 19,3 °C e a temperaturas superiores a 20 °C. A temperatura média no electroíman e no espaço controlo possui uma diferença menor que 0,5 °C, durante as experiências, o que pode ser um factor de variação acrescido entre o espaço controlo e o electroíman. É assim evidente, que o controlo preciso da temperatura é crucial para se conseguir obter resultados claros sobre o efeito de campos magnéticos de diferentes intensidades no crescimento de *Pandorina morum*.

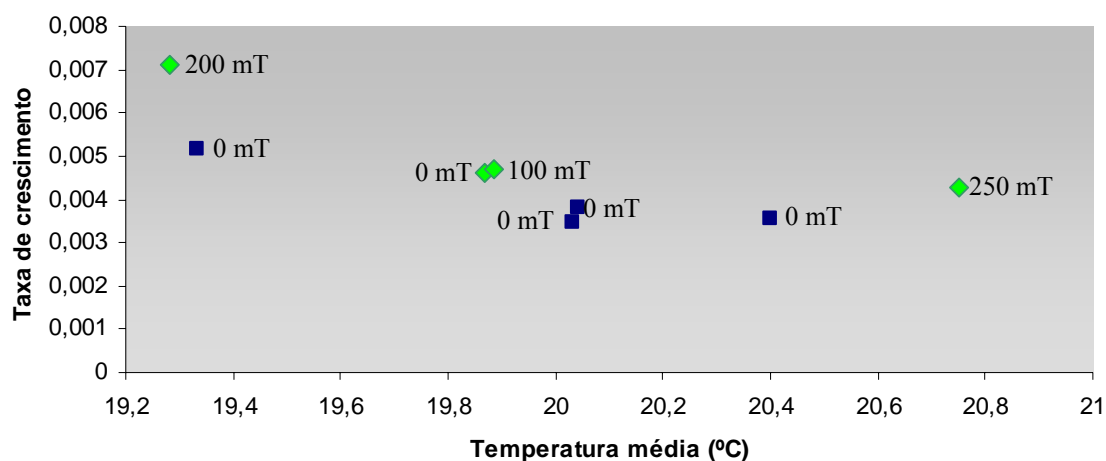


Figura 15 – Representação gráfica das taxas de crescimento médias de *Pandorina morum* quando expostas a diferentes campos magnéticos no electroímã (◆) e no espaço de controlo (■) durante as diferentes experiências em função da sua temperatura média.

Todos os dados analisados até ao momento, relativamente à espécie *Pandorina morum*, não permitem declarar a existência ou ausência de efeitos dos campos magnéticos relativamente às intensidades testadas devido à variabilidade existente na temperatura e nas amostras. No entanto, os resultados sugerem a existência de estimulação do crescimento de *Pandorina morum* quando exposta a campos magnéticos de 200 mT, e inibição deste quando exposta a campos magnéticos de 250 mT.

É necessário efectuar mais estudos com melhor controlo das variáveis.

3.6 Testes Preliminares de *Pediastrum duplex*

Pediastrum duplex é uma alga colonial que forma placas circulares, sem movimento livre na maioria do seu ciclo celular (Bellinger e Singer, 2010), o seu formato em placa permite detectar alterações morfológicas na formação de colónias (caso existam).

Da mesma forma que com *Pandorina morum* também com *Pediastrum duplex* foram realizados vários testes com o propósito de comparar o crescimento utilizando iluminações diferentes (gráficos da figura 16). Tal como observado nos testes realizados em *Pandorina morum*, o crescimento é reduzido em *Pediastrum duplex* com a utilização de LEDS. Observaram-se também diferenças significativas entre o crescimento de *Pediastrum duplex* no electroíman e no espaço controlo com iluminação fluorescente, e tal como em *Pandorina morum*, as diferenças devem-se a diferentes intensidades luminosas.

Recorrendo ao teste t-student, com um intervalo de confiança de 95%, verificou-se que as diferenças no crescimento de *Pediastrum duplex* quando se compara a iluminação fluorescente com a iluminação através de LEDS são estatisticamente significativas a partir das 48 horas (gráfico 1 da figura 16). Ao comparar o crescimento no espaço controlo e no electroíman com iluminação fluorescente, observaram-se diferenças estatisticamente significativas após 216 horas (gráfico 3 da figura 16). Ao contrário do observado com *Pandorina morum*, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os crescimentos de *Pediastrum duplex* utilizando LEDS no espaço controlo (gráfico 2 da figura 16). No entanto, o desvio padrão observado na amostra colocada no espaço controlo é manifestamente elevado.

Tal como *Pandorina morum*, também aqui se optou por considerar como controlo a amostra colocada no electroíman com campo magnético de intensidade 0 mT e iluminação fluorescente.

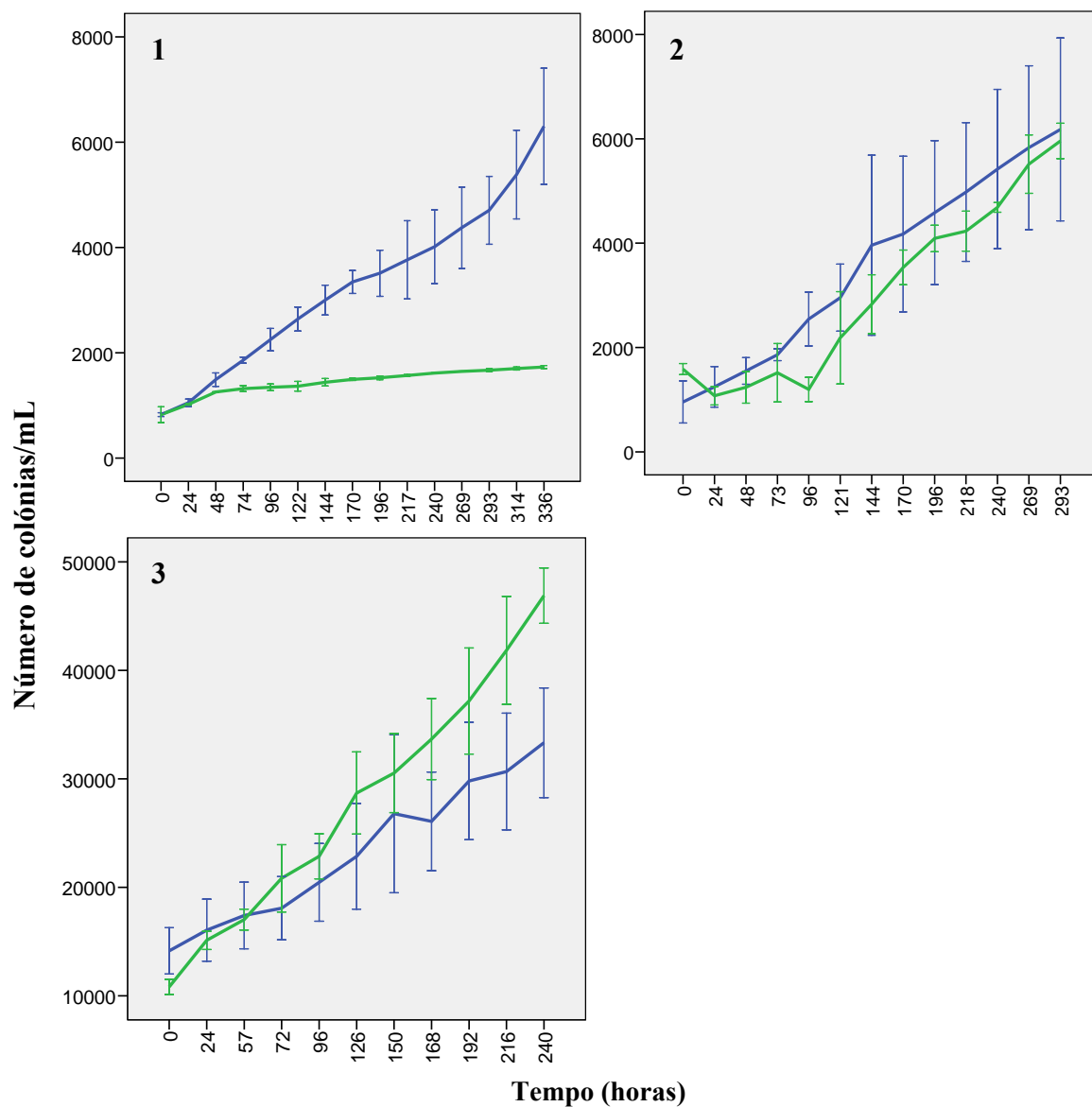


Figura 16 – Curvas de crescimento obtidas para *Pediastrium duplex* quando expostas a diferentes iluminações no espaço de controlo e no electroíman com um campo de 0 mT. Os valores representam a média do número de colónias por mililitro e as barras o coeficiente de variação (desvio padrão). **1** – Iluminação com luz fluorescente no espaço de controlo e iluminação com LED no electroíman (azul – amostras com iluminação de luz fluorescente; verde – amostras com iluminação com luz de LED); **2** – Iluminação com LED (azul – amostras no espaço de controlo; verde – amostras no electroíman); **3** – Iluminação com luz fluorescente (azul – amostras no espaço de controlo; verde – amostras no electroíman).

3.7 Efeito do campo magnético no crescimento de *Pediastrum duplex*

Para facilitar a interpretação de resultados, as várias experiências estão esquematizadas na tabela seguinte (tabela 5).

Tabela 5 – Valores de campo magnético no espaço controlo e no electroíman durante o decorrer das várias experiências.

	Campo electromagnético	
	Espaço controlo	Electroíman
1	0,065 mT	0 mT
2	0,065 mT	100 mT
3	0,065 mT	200 mT
4	0,065 mT	250 mT

Ao observar as taxas de crescimento das culturas expostas ao campo magnético (gráfico na figura 17), observa-se um crescimento superior e estatisticamente significativo, nas culturas expostas a um campo magnético de intensidade de 200 mT e seguidamente nas culturas expostas a 250 mT. Não se observam diferenças estatisticamente significativas entre o crescimento das amostras expostas a 100 e 0 mT. Estes resultados estão em concordância com o que foi observado em *Pandorina morum*. Também em *Pediastrum duplex* existe um comportamento semelhante entre as amostras que se encontram no espaço controlo e no electroíman com campos magnéticos de várias intensidades, à excepção das amostras correspondentes a 200 mT. Estas últimas apresentam um comportamento distinto e isolado, sendo que as amostras expostas ao campo magnético de intensidade 200 mT, tal como em *Pandorina morum*, apresentam a taxa de crescimento mais elevada. No entanto, as amostras da experiência 3 no espaço controlo apresentam uma taxa de crescimento que não é estatisticamente diferente da observada na experiência 2. Tendo em consideração os resultados obtidos para *Pandorina morum*, esta variação pode sugerir uma anomalia nas amostras da experiência 3 no espaço controlo.

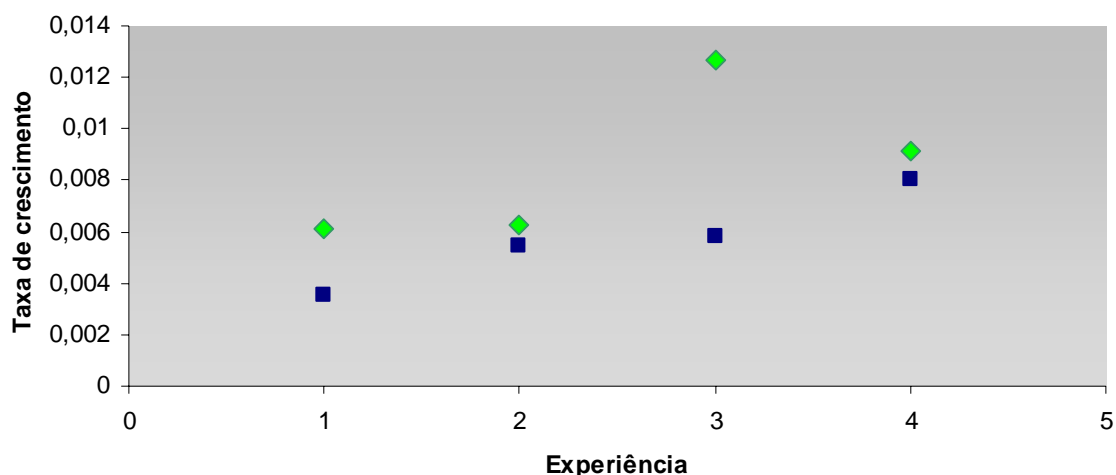


Figura 17 – Representação gráfica das taxas de crescimento médias de *Pediastrum duplex* para as várias experiências no electroíman (♦) e no espaço de controlo (■).

Ao observar a estimulação decorrente das várias experiências (tabela 6), verifica-se que com a aplicação de um campo magnético de intensidade 100 mT a estimulação do crescimento é de apenas de 3 %, ou seja, nula. Com um campo magnético de 200 mT a estimulação do crescimento é de 108 % e com um campo magnético de 250 mT a estimulação é de 50 %. Os valores de estimulação observados no espaço controlo, ao contrário do observado em *Pandorina morum*, não são semelhantes aos observados no electroíman. A estimulação verificada nas amostras das experiências 2 e 3 é muito semelhante, 53% e 64% respectivamente. O mesmo não acontece com a estimulação nas amostras da experiência 4, sendo esta a mais elevada das amostras do espaço controlo, 126%. Os dados obtidos confirmam o que foi referido anteriormente, que existe uma ou mais variações entre as diferentes experiências. Da mesma forma que em *Pandorina morum*, a comparação entre as taxas de crescimento de *Pediastrum duplex* quando exposto a diferentes campos magnéticos, por si só, não permite conclusões definitivas.

Tabela 6 – Índices de crescimento das amostras de *Pediastrum duplex* expostas a vários campos magnéticos de diferentes intensidades e das amostras colocadas no espaço controlo durante o mesmo período de tempo.

Amostras no electroíman	Taxa de Crescimento	Desvio Padrão	Estimulação (%) (mínimo – máximo)
1	$6,09 \times 10^{-3}$	$3,49 \times 10^{-4}$	
2	$6,25 \times 10^{-3}$	$4,311 \times 10^{-5}$	3 (-10 – 17)
3	$1,27 \times 10^{-2}$	$9,29 \times 10^{-4}$	108 (83 – 137)
4	$9,11 \times 10^{-3}$	$8,24 \times 10^{-5}$	50 (40 – 60)
Amostras no espaço controlo			
1	$3,56 \times 10^{-3}$	$4,66 \times 10^{-4}$	
2	$5,44 \times 10^{-3}$	$1,05 \times 10^{-3}$	53 (9 – 110)
3	$5,84 \times 10^{-3}$	$1,29 \times 10^{-3}$	64 (13 – 131)
4	$8,05 \times 10^{-3}$	$3,19 \times 10^{-4}$	126 (92 – 171)

De forma a minimizar as variações exteriores entre as diferentes experiências efectuou-se a diferença entre as amostras no espaço controlo e no electroíman (gráfico da figura 18). Consegue-se dessa forma observar que com 200 mT a taxa de crescimento é claramente diferente das restantes. As taxas de crescimento com os campos magnéticos de intensidades 100 e 250 mT são menores que a de 0 mT, mas não diferem significativamente entre si. Estes resultados sugerem que o campo magnético com uma intensidade 200 mT aumenta o crescimento de *Pediastrum duplex*, enquanto que campos magnéticos de intensidades 100 e 250 mT podem possuir um efeito inibitório ou nulo. A elevada diferença encontrada na experiência relativa a 200 mT pode estar relacionada, como já foi referido anteriormente, com uma anomalia nas amostras do espaço de controlo. São necessários novos testes e experiências para se conseguir perceber se os indícios aqui apresentados são reais.

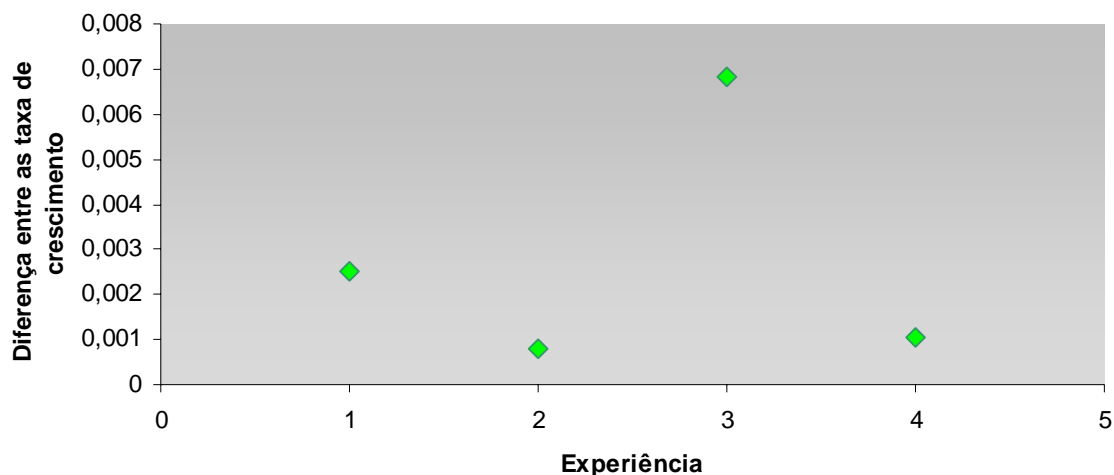


Figura 18 – – Representação gráfica da diferença entre as taxas de crescimento das amostras de *Pediatrux duplex* no espaço controlo e as amostras colocadas no electroímã durante as diferentes experiências.

No caso de *Pandorina morum* foi observado que a variabilidade entre as várias experiências estava relacionada com a variação da temperatura. Ao observar os dados relativos a *Pediatrux duplex* ordenados pelas diferentes temperaturas (gráfico da figura 19) observa-se uma maior variação que nos resultados de *Pandorina morum*, mesmo ignorando a amostra no espaço controlo relativa à experiência 3 (já foi referida anteriormente como tendo um comportamento diferente do resto). A observação do gráfico sugere a existência de outras variações, para além da temperatura e dos campos magnéticos, esta ultima apenas nas amostras colocadas no electroímã. Neste caso observa-se que as taxas de crescimento mais baixas correspondem a temperaturas entre 19,8 e 20,1 °C. Mas tanto com temperaturas superiores a 20,4 °C como com temperaturas inferiores a 19,6 °C se observam taxas de crescimento mais elevadas. Ao observar as curvas de crescimento das várias amostras nas diferentes experiências (anexo VI) verifica-se que as amostras correspondentes à experiência de 250 mT se encontram no final da fase exponencial, este facto pode ter influenciado o resultado, dando origem a uma taxa de crescimento superior à real.

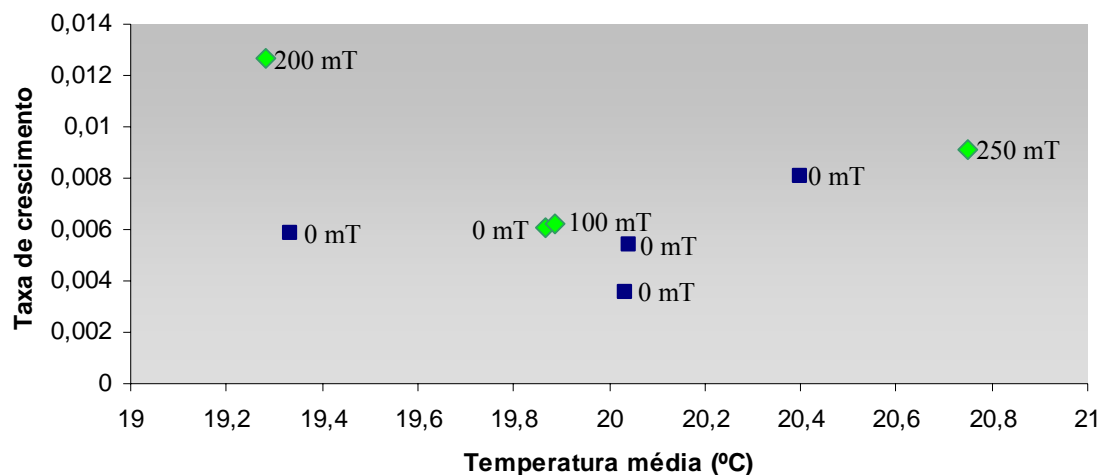


Figura 19 – Representação gráfica das taxas de crescimento médias de *Pediastrum duplex* quando expostas a diferentes campos magnéticos no electroímã (♦) e no espaço de controlo (■) durante as diferentes experiências em função da sua temperatura média.

Tendo em consideração todos os dados apresentados, verifica-se que tal como em *Pandorina morum*, as variações existentes não permitem afirmar a existência de uma alteração significativa na taxa de crescimento devido à exposição a campos magnéticos de várias intensidades. Os resultados sugerem no entanto um efeito estimulador do campo magnético de intensidade 200 mT, e um efeito de inibição de campos magnéticos de intensidades 100 e 200 mT em *Pediastrum duplex*.

Contudo é de ressaltar a necessidade de estudos posteriores para averiguar os efeitos reais dos campos magnéticos de diferentes intensidades na taxa de crescimento de *Pediastrum duplex*.

3.8 Alterações morfológicas devido à exposição ao campo magnético

Não foram observadas alterações morfológicas em nenhuma das três espécies estudadas devido à exposição a campos magnéticos. Não se observaram também alterações no movimento de natação de *Pandorina morum*.

5. Conclusão e perspectivas futuras

O estudo anteriormente descrito utilizou três espécies distintas de clorófitas, *Spirogyra sp.*, *Pandorina morum* e *Pediastrum duplex*. Neste estudo pretendeu-se observar os efeitos de campos magnéticos contínuos de várias intensidades no crescimento e morfologia de diferentes espécies, e identificar os factores críticos para a obtenção de resultados claros. A avaliação do crescimento foi feita de forma distinta em *Spirogyra sp.*. Enquanto em *Spirogyra sp.* se observou e registou o tempo médio entre mitoses, em *Pandorina morum* e *Pediastrum duplex* efectuaram-se contagens celulares utilizando uma câmara de Sedgwick-Rafter. Deste estudo é possível retirar várias conclusões, estando as mesmas descritas em seguida.

1. Os campos magnéticos com intensidades entre 50 e 250 mT influenciam o crescimento de *Spirogyra sp.*. Estes aumentam o intervalo de tempo entre duas mitoses consecutivas, e naturalmente diminuem a taxa de crescimento. O efeito é mais pronunciado quanto mais elevado é o campo magnético.

2. Os efeitos observados devidos aos campos magnéticos são crónicos, podendo ser camuflados por curtas exposições. Estes revelam-se com exposições prolongadas e não com exposições agudas.

3. Existem indícios de existência de alterações na taxa de crescimento de *Pandorina morum* e *Pediastrum duplex*, mas os dados obtidos não permitem chegar a uma conclusão definitiva. A diferença entre as taxas de crescimento das amostras expostas e das amostras no espaço controlo não foi o suficiente para clarificar os resultados obtidos.

4. O comportamento de *Pandorina morum* e *Pediastrum duplex* durante as várias experiências é semelhante, apesar de o ultimo apresentar taxas de crescimento mais elevadas.

5. Pequenas variações de temperatura, em determinadas gamas, alteram significativamente o crescimento de *Pandorina morum* e *Pediastrum duplex*.

6. Das espécies estudadas, a *Spirogyra sp.* demonstrou uma maior resistência às pequenas alterações de temperatura observadas.

7. Variações no estado inicial da cultura, como um número muito elevado de colónias causam alterações na taxa de crescimento de *Pediastrum duplex*.

8. Os campos magnéticos utilizados não causaram alterações morfológicas em nenhuma das espécies estudadas.

9. As várias espécies estudadas possuem limitações. A *Spirogyra sp.* possui limitações no número de mitoses consecutivas observadas, apenas é possível com o protocolo actual observar 3 mitoses consecutivas num número limitado de indivíduos. Já *Pandorina morum* e *Pediastrum duplex* permitem adquirir dados na ordem dos milhares, mas sem observações célula a célula. *Pandorina morum* e *Pediastrum duplex* demonstram uma elevada sensibilidade a pequenas alterações de temperatura quando na gama dos 19 °C.

Os resultados obtidos com *Pandorina morum* e *Pediastrum duplex* são exemplo de como as condições externas necessitam de ser convenientemente controladas e verificadas, alterações de temperatura quando esta se encontra próxima da temperatura ideal, mesmo que apenas de 0,2°C ou 0,3°C são suficientes para induzirem alterações na taxa de crescimento. Como devido à existência de um único electroímã não se conseguem seguir as indicações de Repacholi e Greenebaum (1999), sendo necessário possuir sempre amostras não expostas ao campo magnético de forma a perceber se as variações observadas se devem à temperatura, ao estado da cultura ou ao efeito do campo magnético.

De forma a melhorar o estudo é essencial perceber se os LEDS possuem um efeito de sensibilização na *Spirogyra sp.*, para isso deve-se repetir a experiência efectuada utilizando uma iluminação fluorescente e verificar se as observações actuais se mantêm. É imprescindível repetir as experiências com *Pandorina morum* e *Pediastrum duplex*.

O conhecimento adquirido durante o decorrer deste estudo, permite sugerir alterações às experiências efectuadas com o propósito de melhorar os resultados. Inicialmente é necessário testar a resposta das várias espécies a alterações de temperatura, definindo a gama de temperaturas em que pequenas alterações não afectam consideravelmente a taxa de crescimento, e as variações máximas de temperatura toleradas pela amostra sem alterações na taxa de crescimento. Com esses parâmetros será possível definir as condições de temperatura ideais para o estudo. É necessário utilizar amostras que se encontrem sensivelmente a meio da fase exponencial da curva de crescimento, ou seja amostras com um tamanho inicial de aproximadamente 10 000 colónias/mL para *Pediastrum duplex* e de 5 000 colónias/mL para *Pandorina morum*. Com estes dois parâmetros controlados, e um controlo simultâneo em outro electroímã semelhante é possível obter resultados fidedignos sobre o efeito de diferentes intensidades de campo magnético em *Pandorina morum* e *Pediastrum duplex*.

Como referido anteriormente, este estudo tem como objectivo principal servir de base e suporte para a verificação de alterações na taxa fotossintética devido à exposição a campos magnéticos de diferentes intensidades. Das três espécies estudadas e com as condições utilizadas, *Spirogyra sp.* foi considerada a mais adequada ao estudo de alterações na taxa fotossintética, pois foi a única que demonstrou um claro efeito da exposição a campos magnéticos de diferentes intensidades e uma menor sensibilidade a alterações das condições externas. É necessário repetir parte deste estudo com as alterações propostas anteriormente, de forma a compreender melhor os efeitos dos campos magnéticos nestas três espécies de clorófitas antes de se avançar para o estudo das alterações na taxa fotossintética.

6. Bibliografia

- Aksenov, S; Grunina, T; Goriachev, S. Characteristics of low frequency magnetic field effect on swelling of wheat seeds at various stages. **Biofizika**. 46 (2001) 1127-1132;
- Aldinucci, C; Garcia, J; Palmi, M; Sgaragli, G; Benocci, A; Meini, A; et al. The effect of strong static magnetic field on lymphocytes. **Bioelectromagnetics**. 24 (2003) 109-117;
- Amara S., Abdelmelek H., Sakly M. – Effect of acute exposure to magnetic field on ionic composition of frog sciatic nerve. **Pakistan Journal of Medical Sciences**. 20 (2004) 91-96;
- Araujo, F; Pires, M; Frankel, R; Bicudo, C. Magnetite and Magnetotaxis in Algae. **Biophysical Society**. 50 (1986) 375-378;
- Barsanti, L; Gualtieri, P. **Algae anatomy, biochemistry, and biotechnology**. Nova Iorque, Estados Unidos da America: Taylor & Francis, 2006. 1-10; 27-29;
- Bauréus, M; Sommarin, M; Persson, R; Salford, G; Eberhardt, L. Interactions between weak low frequency magnetic fields and cell membranes. **Bioelectromagnetics**. 25 (2003) 395-402;
- Bellinger, E; Sigee, D. **Freshwater algae identification and use as bioindicators**. Oxford, Reino Unido: Wiley-Blackwell, 2010. 1-2; 19; 153; 175; 185;
- Belova, A; Lednev, V. Activation and inhibition of gravitropic reaction of plants using weak combined magnetic fields. **Biofizika**. 45 (2000a) 1102-1107;
- Belova, A; Lednev, V. Dependence of gravitotropic reaction in segments of flax stems on frequency and amplitude of variable components of weak combined magnetic field. **Biofizika**. 45 (2000b) 1108-1111;
- Berden, M; Zimec, A; Jerman, I. New biological detection system for weak ELF magnetic fields and testing of the paramagnetic resonance model. **Electro and Magnetobiology**. 20 (2001) 27;
- Bian, X; Hughes, Jr; Huang, Y; Cidlowski, J; Putney, Jr. Roles of cytoplasmic Ca^{2+} and intracellular Ca^{2+} stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. **American Journal of Physiology**. 272 (1997) C1241-C1249;

Bioinitiative Report, A Scientific Perspective on Health Risk of Electromagnetic Fields. Bioinitiative. [15 de Novembro de 2009] Disponível em: <http://www.bioinitiative.org/report/index.htm>;

Blakemore, R. Magnetotactic bacteria. **Science**. 190 (1975) 377-379;

Bodega, G; Forcada, I; Fernandez, B. Acute and chronic effects of exposure to a 1-mT magnetic field on the cytoskeleton, stress proteins, and proliferation of astroglial cells in culture. **Environmental Research**. 98 (2005) 355-362;

Bras, W ; Diakun, G ; Dias, F ; Maret, G ; Kramer, H ; Bordas, J ; Medrano, J. The susceptibility of pure tubulin to high magnetic field: a magnetic birefringence and X-ray fiber diffraction study. **Biophysical Journal**. 74 (1998) 1509-1521;

Brendel, H. Niehaus, M; Lerchl, A. Direct suppressive effects of weak magnetic fields (50 Hz and 16 2/3 Hz) on melatonin synthesis in the pineal gland of Djungarian hamsters (*Rhodopus sungorus*). **Journal of Pineal Research**. 29 (2000) 228-233;

Buemi, M; Marino, D; Di Pasquale, G; Floccari, F; Senatore, M; Aloisi, C; et al. Cell proliferation /cell death balance in renal cell cultures after exposure to a static magnetic field. **Nephron**. 87 (2001) 269-273;

Burns, D; Macdonald, S. **Physics for biology and pre-medical students**. 2ª edição. Filipinas: Addison-wesley publishers limited, 1975. 462-466;

Carlo, D; White, N; Guo, F; Garrett, P; Litovitz, T. Chronic electromagnetic field exposure decreases HSP70 levels and lowers cytoprotection. **Journal of Cellular Biochemistry**. 84 (2002) 447-454;

Celestino, C; Picazo, M; Toribio, M; Alvare-Ude, J. Influence of 50 Hz electromagnetic fields on recurrent embryogenesis and germination of cork oak somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 54 (1998) 65-69;

Cellini, L ;Grande, R ; Di Campli, E ; et al. Bacterial response to the exposure of 50 Hz electromagnetic fields. **Bioelectromagnetics**. 29 (2008) 302-311;

Chionna, A; Dwikat, M; Panzarini, E; Tenuzzo, B; Carla, C; Verri, T; Paglira, P; Abbro, L; Dini, L. Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure. **European Journal of Histochemistry**. 47 (2003) 299-308 ;

Chow, K; Tung, L. Magnetic field exposure enhances DNA repair through the induction of DnaK/J synthesis. **FEBS Letters**. 478 (2000)133-136;

- Cossariza, A; Monti, D; Bersani, F; Cantini, M; Cadessi, R; Sacchi, A; Franceschi, C. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. 160 (1989) 692-698;
- Coulton, L; Harris, P; Barker, A; Pockley, G. Effect of 50 Hz Electromagnetic fields on the induction of heat-shock protein gene expression in human leukocytes. **Radiation research**. 161 (2004) 430-434;
- Del Re, B; Bersani, F; Mersirca, P; et al. Synthesis of DnaK and GroEL in *Escherichia coli* cells exposed to different magnetic field signals. **Bioelectrochemistry**. 69 (2006) 99-103;
- Dini, L; Abbro, L. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. **Micron**. 36 (2005) 195-217;
- El May, Alya; Snoussi, Serra; Miloud, Najla; Maatouk, Imed; Abdelmelek, Hafedh; Aïssa, Risha; Landoulsi, Ahmed – Effects of static magnetic field on cell growth, viability, and differential gene expression in *Salmonella*. **Foodborne Pathogens and Disease**. 6:6 (2009) 547-552;
- Fanelli, C ; Coppola, S ; Barone, R ; Colussi, C ; Gualandi, G ; Volpe, P ; et al. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca^{2+} influx. **FASEB Journal** 13 (1999) 95-102;
- Fojt , L; Klapetek, P; Strašák, L; Vetterl, V. 50 Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria. **Micron**. 40 (2009) 918-922;
- Fojt, L; Strašák, L; Vetterl, V. Effect of electromagnetic fields on the denitrification activity of *Paracoccus denitrificans*. **Bioelectrochemistry**. 70 (2007) 91-95;
- Frankel, R. Magnetic guidance of organisms. **Annual Review Biophysics & Bioengineering**. 14 (1984) pag: 85-103;
- Galland, P; Pazur, A. Magnetoreception in plants. **Current Topics in Plant Research**. 118 (2005) 371-389;
- Gelin, F; Boogers, I; Noordelos, A; et al. Resistant biomolecules in marine microalgae of the classes Eustigmatophyceae and Chlorophyceae: geochemical implications. **Organic Geochemistry**. 26 (1997) 659-675;
- Gerthsen, C; Kneser; Voguel, H. **Física**. 2ª edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1998. 361-364;

- Giancoli, D. **Physics principles with applications**. 5ª edição. New Jersey, 1998. 588-590; 610, 611;
- Guillard, R; Sieracki, M. **Counting cells in cultures with the light microscope**. Algal culturing techniques. Oxford, Reino Unido: Elsevier Academic Press, 2005. 239-253;
- Gutzeit, H. Interactions of stressors and the limits of cellular homeostasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 283 (2001) 721-725;
- Hamada, H; Witkus, R; Griffith, Jr. Cell surface changes during electromagnetic field exposure. **Experimental Cell Biology**. 57 (1989) 1-10;
- Hirano, M; Ohta, A; Abe, K. Magnetic fields effects on photosynthesis and growth of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 86 (1998) 313-316;
- Hirose, H; Nakahara, T; Zhang, Q; Yonei, S; Miyakoshi, J. Static magnetic field with a strong magnetic field gradient (41.7 mT/m) induces c-Jun expression in HL-60 cells. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim**. 39 (2003) 348-352;
- Hofseth, L.; Hussain, S; Harris, C. P53: 25 years after its discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**. 25 (2004) 177-181;
- Jajte, J; Zmyslony, M; Palus, J; Dziubaltowska, E; Rajkowska, E. Protective effect of melatonin against in vitro iron ions and 7 mT 50Hz magnetic field-induced DNA damage in rat lymphocytes. **Mutation Research**. 483 (2002) 57-64;
- Junkersdorf, B; Baur, H; Gutzelt, H. Electromagnetic fields enhance the stress response at elevated temperatures in nematode *Caenorhabditis elegans*. **Bioelectromagnetics**. 21 (2000) 100-106;
- Kang, K; Bouhouche, I; Fortin, D; Baulieu, E ; Grazia-Catelli, M. Luciferase activity and synthesis of Hsp 70 and Hsp 90 are insensitive to 50 Hz electromagnetic fields. **Life Sciences**. 63 (1998) 489-497;
- Khodarahmi, Íman; Mobasheri, Hamid; Firouzi, Masoumeh. The effect of 2.1 T static magnetic field on astrocyte viability and morphology. **Magnetic Resonance Imaging**. 28 (2010) 903-909;
- Kirschvink, Joseph; Winklhofer, Michael; Walker, Michael. Biophysics of magnetic orientation: strengthening the interface between theory and experimental design. **Journal of the Royal Society Interface**. 7 (2010) S179-S191;

- Komeili, Arash. Molecular Mechanisms of Magnetosome formation. **Annual Review of Biochemistry**. 76 (2007) 351-366;
- Lembi, C; O'neal, S; Sepencer, D. **Algae as weeds; economic impact, ecology, and management alternatives**. Algae and Human Affairs. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press, 1988. 455-481;
- Li, S.; Chow, K. Magnetic field exposure induces DNA degradation. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 280 (2001) 1385-1388;
- Li, Z; Guo, S; Li L.; Cai M. Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. **Bioresource Technology**. 98 (2007) pag: 700-705;
- Lin, H; Opler, M; Head, M; Blank, M; Goodman, R. Electromagnetic field exposure induces rapid, transitory heat shock factor activation in human cells. **Journal of Cellular Biochemistry**. 66 (1997) 482-488;
- Lindström, K. Nutrient requirements of the dinoflagellate *Peridinium gatunense*. **Journal of Phycology**. 27 (1991) 207-219;
- Lisi, A; Pozzi, D; Pasquali, E; Rieiti, S; Girasole, M; Cricenti, A; Generosi, R; Serafino, L.; Coungiu-Castellano, A; Ravagnan, G; Giuliani, L; Grimaldi, S. Three dimensional (3D) analysis of the morphological changes induced by 50 Hz magnetic field exposure on human lymphoblastoid cells (Raji). **Bioelectromagnetics**. 21 (2000) 46-51;
- Lowenstam, A. Magnetite in denticle capping in recent chitons (*polyplacophora*). **Geological Society of America Bulletin**. 73 (1962) 435-438;
- Meÿer, G; Holland, N; Papastamatiou, P. Sharks can detect changes in the geomagnetic field. **Journal of the Royal Society Interface**. 2 (2005) 129-130;
- Miyakawa, T; Yamada, S; Harada, S; Ishimori, H; Yamamoto, H; Hosono, R. Exposure of *Caenorhabditis elegans* to extremely low frequency high magnetic fields induces stress response. **Bioelectromagnetics**. 22 (2001) 333-339;
- Miyakoshi, J. Effects of static magnetic fields at cellular level. **Biophysics and Molecular Biology**. 87 (2005) 213-223;
- Miyakoshi, J; Mori, Y; Yaguchi, H; Ding, G; Fujimori, A. Supression of heat-induced hsp-70 by simultaneous exposure to 50 mT magnetic field. **Life Sciences**. 66 (2000) 1187-1196;

- Mora, V; Davidson, M; Wild, M; Walker, M. Magnetoreception and its trigeminal mediation in the homing pigeon. **Nature**. 432 (2004) 508-511;
- Morehouse, C; Owen, R. Exposure to low-frequency electromagnetic fields does not alter HSP70 expression or HSF-HSE binding in HL60 cells. **Radiation Research**. 153 (2000) 658-662;
- Motta, M; Montenegro, E; Stamford, M; Silva, R. Changes in *Saccharomyces cerevisiae* development induced by magnetic fields. **Biotechnology Progress**. 17 (2001) 970-973;
- Motta, M; Muniz, J; Schuler, A; Motta, M. Static magnetic fields enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation. **Biotechnology Progress**. 20 (2004) 393-396;
- Newman, J; Watson, R. Preliminary observations on the control of the algal growth by magnetic treatment of water. **Hydrobiologia**. 415 (1999) 319-322;
- Nuñez, G; Clarke, F. The Bcl-2 family of proteins : regulators of cell death and survival. **Trend in Cell Biology**. 4 (1994) 399-403;
- NRC. Possible health effects of exposure to residential electric and magnetic fields. **National Research Council, Washington: National Academy Press**.
- Palmer, G. A composite rating of algae tolerating organic pollution. **Journal of Phycology**. 5 (1969) 78-82;
- Paradisi, S; Donelli, G; Santini, S; Straface, E; Malorni, W. A 50 Hz magnetic field induces structural and biophysical changes in membranes. **Bioelectromagnetics**. 14 (1993) 247-255;
- Pipkin, J; Hinson, W; Young, J; Rowland, K; Shaddock, J; Tolleson, W; Duffy, P; Casciano, D. Induction of stress proteins by electromagnetic fields in cultured HL-60 cells. **Bioelectromagnetics**. 20 (1999) 347-357;
- Polk, H; Postoe, E. **Biological effects of electromagnetic fields**. 2^a edição. Florida: CRC Press, 1996;
- Popov, V; Svitkina, M; Margolis, B; Tsong, Y. Mechanism of cell protrusion formation in electrical field: the role of actin. **Biochemical Biophysical Acta**. 1066 (1991) 151-158;
- Popovsky', J; Pfister, L. **Dinophyceae (Dinoflagellida)**. Germany: Süßwasserflora von Mitteleuropa, 1990. 272;

- Potenza, L; Cucchiarini, L; Piatta, E, et al. Effects of high static magnetic field exposure on different DNAs. **Bioelectromagnetics**. 25 (2004a) 352-355;
- Potenza, L; Ubaldi, L; De Sanctis, R; De Bellis, R; Cucchiaini, L; Dacha, M. Effects of a static magnetic field on cell growth and gene expression in *Escherichia coli*. **Mutation Research**. 561 (2004b) 53-62;
- Prina-Mello, A; Farrel, E; Prendergast, PJ; Campbell, V; Coey, JM. Influence of strong magnetic fields on primary cortical neurons. **Bioelectromagnetics**. 27 (2006) 35-42;
- Raylman, R; Clavo, C; Wahl, RL. Exposure to strong static magnetic fields slows the growth of human cancer cells *in vitro*. **Bioelectromagnetics**. 17 (1996) 358-363;
- Repacholi, H; Greenbaum, B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs. **Bioelectromagnetics**. 20 (1999) 133 – 160;
- Rieiti, S; Manni, V; Lisi, A ; Giuliani, L; Sacco, D; D ‘Emilia, E ; Cricenti, A ; Generosi, R ; Luce, M ; Grimaldi, S. SNOM and AFM microscopy techniques to study the effect of non-ionizing radiation on the morphological and biochemical properties of human keratinocytes cell line (HaCaT). **Journal of Microscopy**. 213 (2004) 20-28;
- Rosen, A. Mechanism of Action of Moderate-Intensity Static Magnetic Fields on Biological Systems. **Cell Biochemistry and Biophysics**. 29 (2003) 163-173;
- Rosen, S; Rosen, D. Magnetic field influence on Paramecium motility. **Life Science**. 46 (1990) 1509-1515;
- Saffer, D; Phillips, L. Evaluating the biological aspects of in vitro studies in bioelectromagnetics. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**. 40 (1996) 1-7;
- Santoro, N; Lisi, A; Pozzi, D; Pasquali, E. Serafino, A; Grimaldi, S. Effect of extremely low frequency (ELF) magnetic field exposure on morphological and biophysical properties of human lymphoid cell line (Raji). **Biochemical Biophysical**. Acta 1357 (1997) 281-290;
- Shecher, D; Winklhofer, M; Petersen, N; Steidle, J; Hilbig, R; Blum, M. Magnetosensation in zebrafish. **Current Biology**. 15 (2005) R161 – R162;
- Shi, B; Farboud, B; Nuccitelli, R; Isseroff, R. Power-line frequency electromagnetic fields do not induce changes in phosphorylation, localization, or expression of the 27-

- kilodalton heat shock protein in human keratinocytes. **Environ. Health Perspect.** 111 (2003) 281-287;
- Simon, J. **Biological effects of static magnetic fields: a review.** International Cryogenic Material Commissions, Inc.. Boulder, Colorado 284;
- Strašák, L; Vetterl, V; Šmarda, J. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. **Bioelectrochemistry.** 55 (2002) 161-164;
- Tenuzzo, B; Chionna, A; Panzarini, E; Lanubile, R; Tarantino, P; Di Jeso, B; Dwikat, M; Dini, L. Biological effects of 6 mT static magnetic fields: a comparative study in different cell type. **Bioelectromagnetics.** 7 (2006) 560-577;
- Tenuzzo, B; Vergallo, C; Dini, L. Effect of 6 mT static magnetic field on the bcl-2, bax, p53 and hsp70 expression in freshly isolated and *in vitro* aged human lymphocytes. **Tissue and Cell.** 41 (2009) 169-179;
- Teodori, L; Gohde, W; Valente, G; Tagliaferri, F; Coletti, D; Perniconi, B; Bergamaschi, A; Cerella, C; Ghibelli, L. Static magnetic fields affect calcium fluxes and inhibit stress-induced apoptosis in human glioblastoma cells. **Cytometry.** 49 (2002a) 143-149;
- Teodori, L; Grabarek, J; Smolewski, P; Ghibelli, L; Bergamaschi, A; De Nicola, M; Darzynkiewics, Z. Exposure of cells to static magnetic fields accelerates loss of integrity of plasma membrane during apoptosis. **Cytometry.** 49 (2002b) 113-118;
- Torbet, J; Dickens, MJ. Orientation of skeletal muscle actin in strong magnetic fields. **FEBS Lett.** 173 (1984) 403-406;
- Transeau, E. **The Zygnemataceae (Fresh-Water conjugate algae).** Ohio, Estados Unidos da America: The Ohio State University Press, 1951. 123-239;
- Valiron, O; Peris, L; Pikken, G; Schweitzer, A; Saoudi, Y; Remy, C; e tal. Cellular disorders induced by high magnetic fields. **Magnetic Resonance Imaging.** 22 (2005) 334-340;
- Walleczek, J; Liburdy, P. Nonthermal 60-Hz sinusoidal magnetic field exposure enhances $^{45}\text{Ca}^{++}$ uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. **FEBS Letters.** 271 (1990) 157-160;
- Walker, M; Dennis, E; Kirschvink, L. The magnetic sense and its use in long-distance navigation by animals. **Curr. Opin. Neurobiol.** 12 (2002) pag: 735-744;

- Wang, H; Zeng, X; Guo, S; Li, Z. Effects of Magnetic Field on the Antioxidant Defense System of Recirculation-Cultured *Chlorella vulgaris*. **Bioelectromagnetics**. 29 (2008) 39-46;
- Wiskirchen, J; Groenewaeller, EF; Kehlbach, R; Heinzelmann, F; Wittau, M; Rodemann, HP, e tal. Long-term effects of repetitive exposure to a static magnetic field (1.5 T) on proliferation of human fetal lung fibroblasts. **Magnetic Resonance Imaging**. 41 (1999) 464-468;
- Yokoyama, T; Tanahashi, M; Kobayashi, Y; Yamakawa, M; Inaba, T; Kiriya, M; Fukai, I; Fujii, Y. The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in human lymphocytes. **Immunology Letters**. 81 (2002) 107-113;
- York, D. A possible magnetic transducer in birds. **Journal of Theoretical Biology**. 77 (1979) 101-105;

Anexo I

Quadro síntese dos efeitos dos campos magnéticos
(adaptado de Galland et al., 2005)

Organismo/ Tipo celular	Intensidade Magnética	Resposta	Referências
Campos magnéticos homogêneos			
Astrócitos humanos	2.1 T	Sem alterações na viabilidade celular	Khodarahmi et al., 2010
Linfócitos humanos	6 mT (estático)	Alterações na taxa apoptótica; Alterações na concentração de Ca^{2+}	Chionna et al., 2003 Tenuzzo et al., 2009
U937	6 mT	Alterações no formato celular e membrana plasmática;	Chionna et al., 2003
PC12 (feocromocitoma)	1.5 T	Inibe o aumento de Ca^{2+}	Ikehara et al., 2005
Linfócitos de rato	7 mT	Formação de radicais livres; Aumento da morte celular	Jajte et al., 2002
Linfócitos humanos Timócitos FRTL-5 HepG2	6 mT (estático)	Modulação da apoptose	Tenuzzo et al., 2006
<i>Allium cepa</i>	505 μ T	Aumento do crescimento das folhas, da clorofila, de proteínas	Novitsky et al. 2001
<i>Cyclidium sp.</i> (ciliado), <i>Chilomonas sp.</i> (Criptófitas), Dinoflagelados	Várias intensidades em ímanes permanentes	Magnetotaxia, presença de magnetossomas	Bazylinsky et al. 2000
<i>Taxus chinensis</i> var. <i>marei</i>	3.5 mT	Culturas em suspensão: aumento do crescimento celular	Shang et al. 2004
<i>Vicia faba</i>	1.5 mT, 5 mT	Mitose: aumento do tempo de prófase	Rapley et al. 1998
<i>Hordeum vulgare</i>	8 mT	Células em suspensão: diminuição da viabilidade	Piatti et al. 2002
<i>Lactuca sativa</i>	0 – 10 mT	Sementes: aumento da absorção de água	Garcia-Reina et al. 2001
<i>Lens culinaris</i>	17.6 mT	Inibição do crescimento da raiz	Peñuelas et al 2004
<i>Glycine soja</i>	17.6 mT	Inibição do crescimento da raiz	Peñuelas et al 2004
<i>Triticum aestivum</i>	17.6 mT	Inibição do crescimento da raiz	Peñuelas et al 2004
<i>Chlorella vulgaris</i>	<40 mT >58 mT	Aumento do crescimento Diminuição do crescimento	Takahashi e Kamezaki 1985
<i>Pisum sativum</i> , <i>Malus sylvestris</i> , <i>Prunus armenica</i> , <i>Prunus persica</i>	60 mT, íman permanente	Aumento da germinação	Chão e walker 1967
<i>Zea mays</i>	150 mT	Estimulação da germinação, crescimento das raízes	Aladjadjiyan 2002
<i>Triticum aestivum</i>	~ 180 mT, íman permanente	Aumento do crescimento, elevado conteúdo em açúcares	Pittman e Ormrod 1970
<i>Zea mays</i>	60 – 200 mT	Aumento da germinação	Antonow et al. 1982

<i>Chara fragilis, Elodea Vallisneria, Nitella</i>	20 – 215 mT, electroímán	Aumento ou inibição do movimento citoplasmático rotacional	Ssawostin 1930 a
<i>Triticum aestivum</i>	20 – 215 mT	Estimulação do crescimento das folhas primárias	Ssawostin 1930 b
<i>Oryza sativa</i>	150, 250 mT	Aumento da germinação	Carbonell et al. 2000
<i>Glycine Max</i>	300 mT	Sementes: aumento da absorção de água	Kavi 1977; Drobig 1988
<i>Triticum aestivum, T. durum, Hordeum vulgare, Avena fátua</i>	0 – 400 mT, íman permanente	Sem qualquer efeito na germinação ou no crescimento	Gusta et al. 1978
<i>Daucus carota</i>	500 mT	Estimulação do crescimento das raízes aéreas	Kato et al. 1989
<i>Zea mays</i>	500 mT	Estimulação do crescimento da raiz	Kato 1988
<i>Triticum aestivum, Glycine Max, Helianthus annuus</i>	501 mT	Aumento do crescimento	Lebedjet et al. 1975 a, b
<i>Tradescantia sp.</i>	160 – 780 mT	Não possui efeito	Baum e Naumann 1984
<i>Avena sativa</i>	600 mT – 1.8 T	Microfibrilas de celulose irregulares	Gretz et al. 1989
<i>Triticum aestivum</i>	10.8 T	Diminuição de fenilalanina amônia-liase	Hahn et al. 1988
<i>Lilium longiflorum</i>	14 T	Orientação dos tubos polínicos com campo homogêneo	Sperber et al. 1981
<i>Allium cepa</i>	Íman permanente	Mitose em meristemas	Peteiro – Cartelle et al. 1989
<i>Gossypium</i>	Campo constante	Efeito em alguns processos metabólicos	Akhmedova e Hossain 1986
<i>Arachis hypogea</i>	Não definido	Efeito no rendimento	Vakharia e tal. 1991
<i>Hordeum vulgare</i>	Íman permanentes	Aceleração da germinação	Pittman e Ormrod 1971
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Íman permanentes	Aumento do rendimento	Pittman e Anstey 1967
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Não definido	Aumento do amadurecimento de frutos	Boe e Salunkhe 1963
<i>Sinapis alba</i>	Íman permanentes	Aumento da germinação	Edmiston 1972
Campos magnéticos alternados			
U937 Timócitos	0-66 mT	Alterações na apoptose; Aumento da quantidade de Ca^{2+}	Fanelli et al., 1999
<i>Linum bienne</i>	0.1 nT – 1 μ T	Modulação do geotropismo	Belova e Lednev 2000 a, b, 2001 b
<i>Quercus suber</i> L.	15 μ T, 50 Hz	Efeito na embriogênese e na germinação	Celestino et al. 1998
<i>Helianthus annuus</i>	20 μ T, 16 Hz	Aumento do peso fresco, aumento da germinação	Fischer et al. 2004
<i>Triticum aestivum</i>	20 μ T, 16 Hz		
<i>Amphora coffeaeformis</i>	Electromagnético + estático 20.9 μ T, 16 Hz	Aumento da mobilidade, diatomáceas Concentração de Ca^{2+} dependente	McLeod et al. 1987b, Smith et al. 1987 a, 1987 b, Reese et al. 1991
<i>Amphora coffeaeformis</i>	20.9, 41.8 μ T 16, 30, 60 Hz	Não possui efeito na mobilidade	Clarkson et al. 1999, Parkinson e Sulik 1992, Saalman et al. 1992,

			Prasad et al. 1994
<i>Spinacia oleracea</i>	27 – 37 μ T, 7.72 Hz	Modulação da entrada de Ca^{2+} em membranas isoladas	Bauréus Koch et al. 2003
<i>Raphanus sativus</i>	50 μ T, 60 Hz	Diminuição na absorção de CO_2	Yano et al. 2004
<i>Raphanus sativus</i>	50 μ T, 60 Hz	Diminuição do peso, dos cotilédones, da área das folhas	Yano et al. 2004
<i>Raphanus sativus</i>	40 – 78 μ T, 60 Hz	Aumento do peso das raízes e das folhas	Davis 1996
<i>Hordeum vulgare</i>	40 – 78 μ T, 60 Hz		
<i>Sinapis alba</i>	40 – 78 μ T, 60 Hz	Sem efeito	
<i>Vicia faba</i>	10, 100 μ T, 50 Hz	Aumento da permeabilidade a íons nas membranas	Stange et al. 2002
<i>Picea abies</i>	26 μ T, 105 μ T, 50 Hz	Diminuição e aumento da germinação	Ružič et al. 1998 b
<i>Picea abis</i>	10 μ T, 46 Hz		
<i>Chlorella kessleri</i>	20 – 200 μ T, 7.8 Hz	Inibição do crescimento aos 200 μ T	Pazur e Scheer 1992
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			
<i>Scenedesmus obliquus</i>			
<i>Lepidium sativum</i>	100 μ T, 7.8 Hz	Sem efeitos	Ružič et al. 2004 website
<i>Lepidium sativum</i>	100 μ T, 50 Hz	Estimulação do crescimento apenas antes de stress térmico	Sabehat et al. 1998
<i>Lepidium sativum</i>	100 μ T, 50 Hz	Aumento da germinação	Gutzeit 2001
<i>Castanea sativa</i>	250 μ T, 2, 24 Hz	Estimulação do crescimento das raízes	Ružič et al. 1993
<i>Citrus clementina</i>			
<i>Cryptotaenia japónica, hornwort</i>	500 μ T, 7, 14 Hz	Promoção da germinação	Kobavashi et al. 2004
<i>Vicia faba</i>	1.5 mT, 5 mT 50, 60, 75 Hz	Aumento da prófase	Rapley et al. 1998
<i>Picea abies</i>	2 mT, 50 Hz	Inibição do crescimento das raízes, aumento da ramificação	Jerman et al. 1989
<i>Actinidia deliciosa, Kiwi</i>	3.5 mT, 50 Hz	Anomalias morfológicas nos tubos polínicos	Dattilo et al. 2005
<i>Taxus chinensis</i> var. <i>marei</i>	3.5 mT, 50 Hz	Culturas em suspensão: aumento do crescimento celular	Shang et al. 2004
<i>Castanea sativa</i>	1.2 – 5.9 mT, 50 Hz	Modulação do crescimento	Ružič et al. 1992
<i>Triticum aestivum</i>	30 mT, 50 Hz	Estimulação das raízes	Aksenov et al. 2001
<i>Arabidopsis thaliana</i>	5 – 400 mT (electromagnético)	Aumento da germinação	Takimoto et al. 2001
<i>Bryophyllum</i>	0.6 – 1 T	Estimulação da respiração	Fardon et al. 1966
<i>Prunus cerasifera</i>	Não definido	Aumenta o crescimento	Lucchesini e tal. 1992

Anexo II

Esquema de classificação dos diferentes grupos de algas

Reino	Divisão	Classe	Ex: espécies
Prokaryota eubacteria	Cyanophyta	Cyanophyceae	
Eukaryota	Glaucophyta	Glaucophyceae	
	Rhodophyta	Bangiophyceae	
		Florideophyceae	
	Heterokontophyta	Crysophyceae	
		Xanthophyceae	
		Eustigmatophyceae	
		Bacillariophyceae	
		Raphidophyceae	
		Dictyochophyceae	
		Phaeophyceae	
	Haptophyta	Haptophyceae	
	Cryptophyta	Cryptophyceae	
	Dinophyta	Dinophyceae	
	Euglenophyta	Euglenophyceae	
	Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae	
	Chlorophyta	Prasinophyceae	
		Chlorophyceae	<i>Pandorina sp.;</i> <i>Pediastrum sp.</i>
		Ulvophyceae	
		Cladophorophyceae	
		Bryopsidophyceae	
		Zygnematophyceae	<i>Spirogyra sp.</i>
		Trentepohliophyceae	
		Klebsormidiophyceae	
		Charophyceae	
		Dasycladophyceae	

Anexo III

Composição do meio de cultura

LC oligo

Tabela I: composição do meio

Quantidade	Composto
40 mg	Ca(NO ₃) 4H ₂ O
100 mg	KNO ₃
30 mg	MgSO ₄ 7H ₂ O
40 mg	K ₂ HPO ₄
0.5 mL	Oligo I
0.5 mL	Oligo II
1000 mL	dH ₂ O

Tabela II: Composição da solução Oligo I

Quantidade	Composto
0.3 mg	CuSO ₄ 5H ₂ O
0.6 mg	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O
0.6 mg	ZnSO ₄ 7H ₂ O
0.6 mg	CoCl ₂ 6H ₂ O
0.6 mg	Mn(NO ₃) ₂ 4H ₂ O
0.6 mg	C ₆ H ₈ O ₇ H ₂ O
0.6 mg	H ₃ Bo ₃
10 mL	dH ₂ O

Tabela III: Composição da solução Oligo II

Quantidade	Composto
16.25 mg	C ₆ H ₃ O ₇ Fe 5H ₂ O
6.25 mg	FeSO ₄ 7H ₂ O
6.25 mg	FeCl ₃ 6H ₂ O
10 mL	dH ₂ O

L16-V

Tabela IV: Composição do meio

Quantidade	Solução
5 mL	Soluções stock de 1 a 5
0.5 mL	Solução 1
50 µL	Solução de selênio
5 mL	Solução stock 6
0.5 mL	Solução de vitaminas
470 mL	dH ₂ O

Tabela V: Composição da Solução 1

Quantidade	Composto
0.558 g	Na ₂ EDTA•2H ₂ O
0.108 g	FeCl ₃ •6H ₂ O
0.010 g	MnCl ₂ •4H ₂ O
0.027 g	ZnCl ₂
0.0096 g	CoCl ₂ •6H ₂ O
0.048 g	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O
1000 mL	dH ₂ O

Tabela VI: Composição das várias soluções stock

Solução Stock	Quantidade	Composto
1	0.840 g/100 mL	NaHCO ₃
2	0.128 g/100 mL	NaNO ₃
3	0.147 g/100 mL	CaCl ₂ •2H ₂ O
4	0.123 g/100 mL	MgSO ₄ •7H ₂ O
5	0.0114 g/100 mL	Na ₂ O ₃ Si•9H ₂ O
6	0.0174 g/100 mL	K ₂ HPO ₄

Tabela VII: Composição da solução de selênio

Quantidade	Composto
0.00184 g	Na ₂ SeO ₃ •5H ₂ O
1000 mL	dH ₂ O

Tabela VII: Composição da solução de vitaminas

Quantidade	Composto
0.01g	Biotina
0.1g	Cianocobalamina (B ₁₂)
100 mL	dH ₂ O

Nota: Adicionar as vitaminas e a solução stock nº 6 apenas após autoclavar a solução.

Anexo IV

Dados de *Spirogyra* sp.

Amostras no electroíman

1ª-2ª mitose

Intensidade do campo magnético (mT)	Número de células expostas	Média do tempo entre duas mitoses (dias)	Desvio padrão
0	55	2,64	0,485
50	83	4,59	1,169
100	54	6,41	1,967
250	20	17,25	4,447

2ª-3ª mitose

Intensidade do campo magnético (mT)	Número de células expostas	Média do entre duas mitoses (dias)	Desvio padrão
0	58	3,74	1,117
50	166	5,15	1,224
100	85	6,18	1,356

Amostras no espaço cultura

1ª-2ª mitose

Intensidade do campo magnético das experiência paralela (mT)	Número de células expostas	Média do tempo entre duas mitoses (dias)	Desvio padrão
0	51	2,16	0,731
50	50	1,96	0,283
100	56	1,93	0,499
250	32	2,25	0,672

2ª-3ª mitose

Intensidade do campo magnético das experiência paralela (mT)	Número de células expostas	Média do tempo entre duas mitoses (dias)	Desvio padrão
0	85	2,04	0,794
50	99	1,99	0,463
100	104	2,13	0,634

Comparação da iluminação fluorescente com LED

1ª-2ª mitose

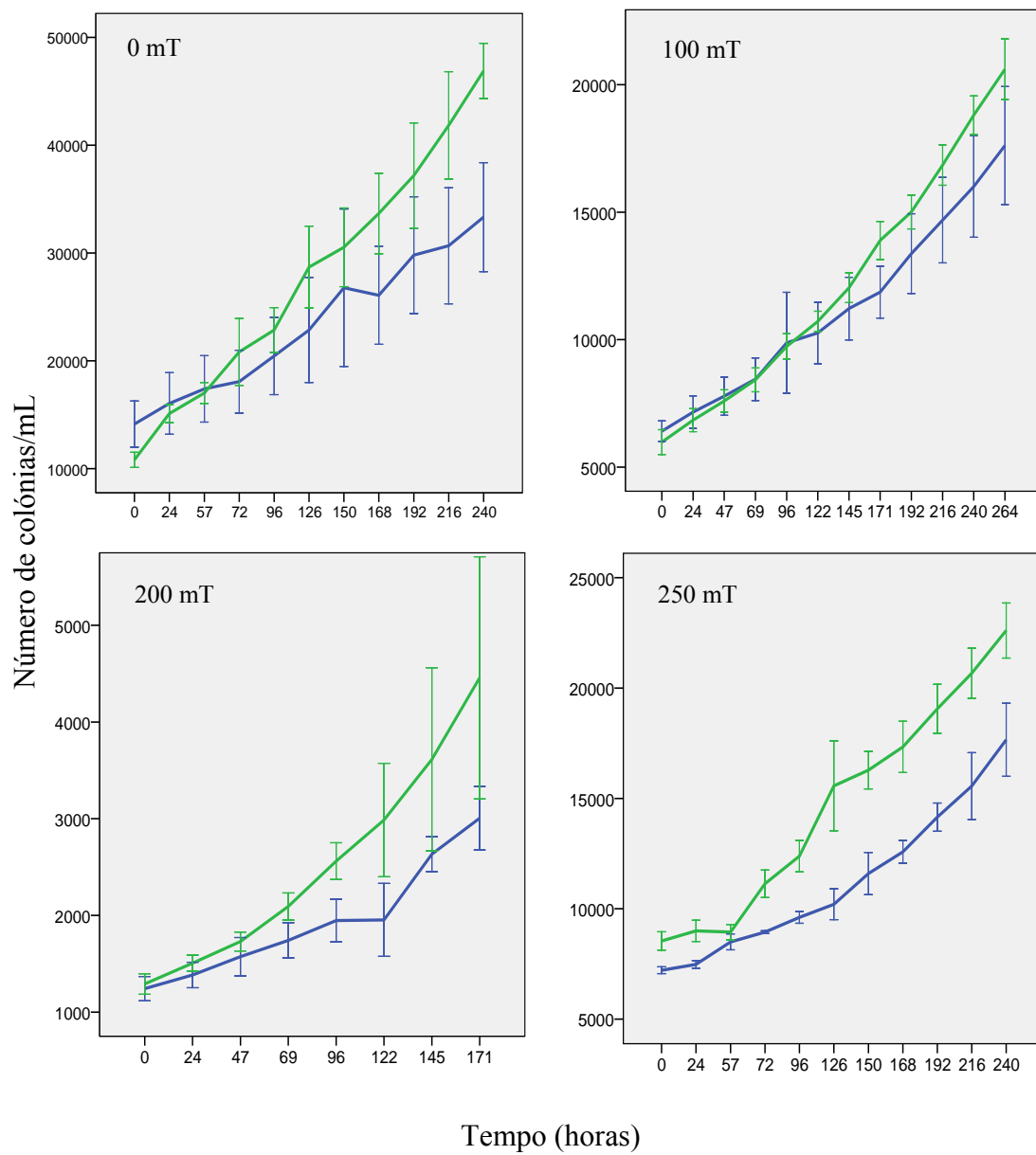
Tipo de iluminação	Número de células expostas	Média do tempo entre duas mitoses (dias)	Desvio padrão
Fluorescente	138	2,01	0,498
LEDs	55	2,64	0,485

2ª-3ª mitose

Tipo de iluminação	Número de células expostas	Média do tempo entre duas mitoses (dias)	Desvio padrão
Fluorescente	203	2,06	0,560
LEDs	58	3,74	1,117

Anexo V

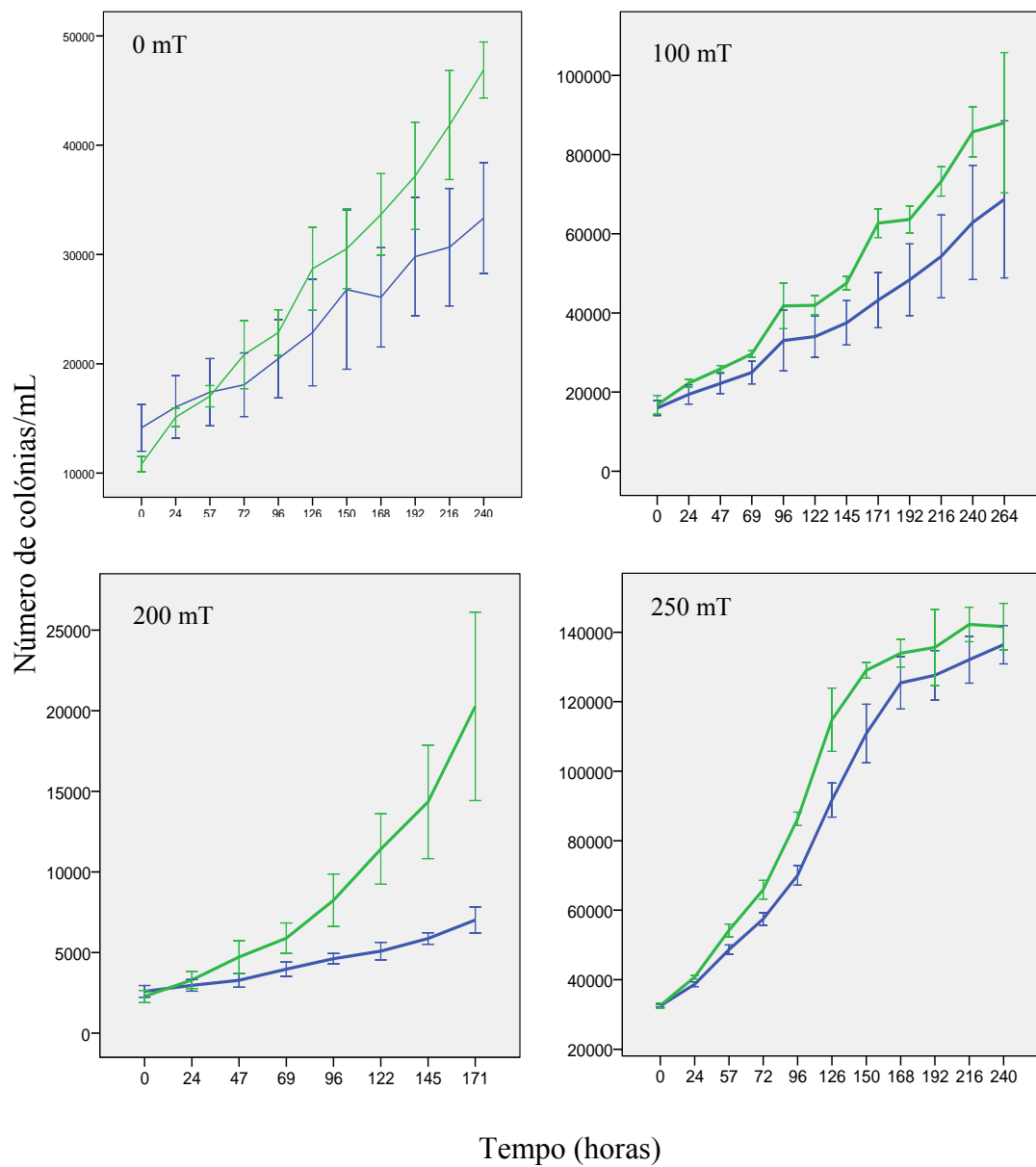
Curvas de crescimento de *Pandorina morum*



(—) a curva verde representa a curva de crescimento média das amostras expostas ao campo magnético; (—) a curva azul representa as amostras do espaço controlo.

Anexo VI

Curvas de crescimento de *Pediastrum duplex*



(—) a curva verde representa a curva de crescimento média das amostras expostas ao campo magnético; (—) a curva azul representa as amostras do espaço controlo.